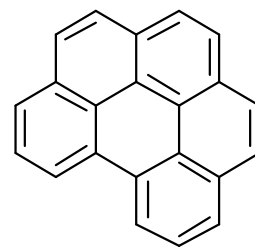
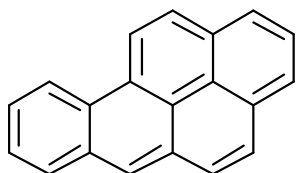


# **Factores que Determinan la Presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos como Contaminantes Agroambientales y Alimentarios**

**Tesis Doctoral**



**Ledicia Rey Salgueiro**









**UNIVERSIDAD DE VIGO**

**Departamento de Química Analítica y Alimentaria**

**Área de Nutrición y Bromatología**

---

# **Factores que Determinan la Presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos como Contaminantes Agroambientales y Alimentarios**

**Ledicia Rey Salgueiro**

**Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencia y  
Tecnología de los Alimentos**

**Ourense, julio de 2008**



**Mercedes Sonia García Falcón**, Profesora Titular, y **Elena Martínez Carballo**, Investigador Isidro Parga Pondal del Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Vigo.

Autorizan:

A Leticia Rey Salgueiro a la presentación del trabajo titulado “**Factores que determinan la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos como contaminantes agroambientales y alimentarios**”, el cual ha sido realizado bajo nuestra dirección y presenta los requisitos exigidos para optar al título de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que conste donde proceda, firmamos la presente autorización en Ourense a 18 de julio de 2008.

Dra. Sonia García Falcón

Dra. Elena Martínez Carballo





*A mi madre*



## Índices

---



## ÍNDICE GENERAL

► JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	1
► INTRODUCCIÓN .....	5
1. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	7
1.1. Clasificación y estructura .....	7
1.2. Síntesis .....	9
2. Metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	10
2.1. Vías de exposición .....	10
2.2. Absorción .....	10
2.3. Distribución y metabolización.....	11
2.4. Excreción .....	14
2.4.1. Excreción de metabolitos a través de heces y orina.....	15
2.4.2. Excreción de metabolitos a través de la leche. ....	15
3.- Toxicidad de los PAHs y sus metabolitos. ....	16
4. Contaminación medioambiental por PAHs .....	20
5. Contaminación de los alimentos por PAHs y sus metabolitos.....	22
5.1. Contaminación en origen .....	22
5.1.1. Fuentes de contaminación de alimentos de origen vegetal.....	23
5.1.2. Fuentes de contaminación de alimentos de origen animal .....	24
5.1.2.1. Contaminación de la leche .....	24
5.1.2.2. Contaminación de moluscos bivalvos .....	25
5.2. Contaminación de los alimentos durante su manipulación o procesado .....	27
5.2.1. Los tratamientos térmicos severos y la síntesis de PAHs.....	28
6. Niveles de PAHs y sus metabolitos en alimentos: Aspectos legales .....	33
► PARTE EXPERIMENTAL .....	35
1. Compuestos y materiales .....	37

1.1. Disolventes .....	37
1.2. Reactivos .....	38
1.3. Patrones.....	39
1.4. Material de laboratorio .....	44
<b>2. Instrumentación.....</b>	<b>44</b>
2.1. Sistemas de determinación .....	44
2.2. Otros instrumentos.....	45
<b>3. Preparación de las disoluciones patrón.....</b>	<b>46</b>
3.1. Disoluciones de PAHs.....	46
3.2. Disoluciones de metabolitos de PAHs .....	47
<b>4. Protocolos analíticos para la determinación de PAHs y sus metabolitos .....</b>	<b>47</b>
<b>► CAPÍTULO I</b>	
<b>Evaluación de la contaminación medioambiental: Determinación de PAHs en turba .....</b>	<b>55</b>
1. Muestreo .....	56
2. Optimización y validación del método analítico .....	57
2.1. Optimización de las condiciones de detección.....	58
2.2. Optimización de la etapa de extracción .....	59
2.2.1. Selección del disolvente de extracción .....	60
2.2.2. Selección de la técnica de extracción.....	61
2.3. Validación del método analítico .....	64
3. Niveles de PAHs en las muestras de turba .....	66
<b>► CAPÍTULO II</b>	
<b>Análisis de alimentos vegetales expuestos a un incendio de una industria química.....</b>	<b>77</b>
1. Muestreo .....	78
2. Determinación de PAHs.....	79
3. Niveles de PAHs en productos vegetales tras el incendio .....	81

### ► CAPÍTULO III

<b>Determinación de PAHs nativos y sus metabolitos en fórmulas lácteas infantiles.....</b>	<b>89</b>
<b>1. Muestreo .....</b>	<b>90</b>
<b>2. Determinación de PAHs y protocolo analítico .....</b>	<b>91</b>
<b>3. La determinación de metabolitos de PAHs .....</b>	<b>94</b>
3.1. Optimización de las condiciones cromatográficas y de detección.....	94
3.2. Estabilidad de los analitos en las disoluciones patrón .....	96
3.3. Optimización del tratamiento pre-analítico .....	96
3.3.1. Extracción .....	97
3.3.2. Hidrólisis enzimática.....	98
3.3.3. Concentración y purificación a través de mini columna C18 .....	101
3.4. Validación del método .....	106
<b>4. Niveles de PAHs nativos y de sus metabolitos en las muestras de leche infantil .....</b>	<b>106</b>
4.1. Determinación de PAHs nativos .....	106
4.2. Determinación de metabolitos de PAHs.....	107

### ► CAPÍTULO IV

<b>Estudio de la presencia de PAHs nativos y sus metabolitos en excretas procedentes de animales de cría.....</b>	<b>111</b>
<b>1. Muestreo .....</b>	<b>112</b>
<b>2. Determinación de PAHs .....</b>	<b>113</b>
<b>3. Determinación de metabolitos de PAHs.....</b>	<b>116</b>
3.1. Optimización de la etapa de hidrólisis enzimática.....	118
3.2. Confirmación de resultados mediante LC-MS/MS .....	119
<b>4. Niveles de PAHs nativos y sus metabolitos en excretas y estiércoles animales .....</b>	<b>121</b>

► **CAPÍTULO V**

<b>Determinación de PAHs en moluscos bivalvos .....</b>	<b>129</b>
<b>1. Muestreo. ....</b>	<b>130</b>
<b>2. Determinación de PAHs .....</b>	<b>132</b>
<b>3. Niveles de PAHs en moluscos bivalvos .....</b>	<b>135</b>

► **CAPÍTULO VI**

<b>Contribución del tostado a la contaminación de alimentos ricos en carbohidratos .....</b>	<b>147</b>
<b>1. Muestreo .....</b>	<b>149</b>
<b>1.1. Muestras de Pan tostado .....</b>	<b>149</b>
<b>1.1.1. Pan tostado comercial .....</b>	<b>149</b>
<b>1.1.2. Pan tostado comercial en el laboratorio .....</b>	<b>149</b>
<b>1.2. Muestras de cereales infantiles .....</b>	<b>153</b>
<b>2. Determinación de PAHs .....</b>	<b>153</b>
<b>2.1. Dificultad en la extracción de PAHs por la presencia de             cenizas en las muestras de pan. ....</b>	<b>156</b>
<b>3. Niveles de PAHs en pan tostado y cereales infantiles .....</b>	<b>158</b>
<b>3.1. Niveles de PAHs en muestras comerciales .....</b>	<b>158</b>
<b>3.1.1. Pan tostado .....</b>	<b>158</b>
<b>3.1.2. Cereales infantiles .....</b>	<b>160</b>
<b>3.2. Niveles de PAHs en pan tostado en el laboratorio .....</b>	<b>160</b>

► <b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>167</b>
-----------------------------	------------

► <b>ANEXO .....</b>	<b>173</b>
----------------------	------------



## ÍNDICE DE TABLAS

### ► INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.</b> Factor Equivalente de Toxicidad para varios PAHs. ....	18
--	----

<b>Tabla 2.</b> Niveles de B[a]P y otros PAHs en alimentos sometidos a diferentes tratamientos culinarios (µg/Kg) .....	32
---	----

### ► PARTE EXPERIMENTAL

<b>Tabla 1.</b> Disolventes empleados en el desarrollo del presente trabajo. ....	37
---	----

<b>Tabla 2.</b> Reactivos empleados, modo de preparación y/o uso al que han sido destinados.....	38
--	----

<b>Tabla 3.</b> Patrones puros de los compuestos objeto de estudio. ....	39
--	----

<b>Tabla 4.</b> Estructura y ficha técnica de los PAHs y metabolitos objeto de estudio. Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006. ....	40
--	----

<b>Tabla 5.</b> Disolventes empleados en la preparación de la disolución madre de 100 mg/L y rango de concentraciones para cada PAH en las disoluciones de trabajo (µg/L).....	46
--	----

<b>Tabla 6.</b> Condiciones cromatográficas para la determinación de PAHs.....	50
--	----

<b>Tabla 7.</b> Condiciones cromatográficas para la determinación de metabolitos de PAHs. ....	50
--	----

<b>Tabla 8.</b> Programa de detección para el detector de FD.....	51
---	----

<b>Tabla 9.</b> Programa de detección para el detector de MS/MS.....	51
--	----

<b>Tabla 10.</b> Pendiente e intervalo de concentraciones de las rectas de calibrado obtenidas para la cuantificación de los PAHs y metabolitos objeto de estudio (µg/L).....	52
---	----

### ► CAPÍTULO I

<b>Tabla 1.</b> Evaluación del n-hexano, diclorometano (DCM) y mezcla de ambos en diferentes proporciones como disolventes de extracción de PAHs en turbas (µg/Kg, n=2).....	61
--	----

<b>Tabla 2.</b> Condiciones de extracción en ASE. ....	62
<b>Tabla 3.</b> Comparación de dos técnicas de extracción: ASE y asistida por baño de ultrasonidos. ....	63
<b>Tabla 4.</b> Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en turba ( $\mu\text{g/Kg}$ , $n=6$ ). ....	65
<b>Tabla 5.</b> Contenido de materia orgánica y niveles de PAHs totales en los diferentes estratos de la turbera de Penido Vello ( $\mu\text{g/Kg}$ , $n=2$ ). ....	67
<b>Tabla 6.</b> Niveles de PAHs totales encontrados en turberas de diferentes países ( $\mu\text{g/kg}$ ). ....	71
<b>Tabla 7.</b> Peso molecular ( $\text{g/mol}$ ), solubilidad ( $\text{mol/L}$ ) y $\log P$ (coeficiente de partición octanol-agua) de los PAHs estudiados. Datos adquiridos de ACS SciFinder Scholar, 2006. ....	74

## ► CAPÍTULO II

<b>Tabla 1.</b> Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en alimentos de origen vegetal ( $\mu\text{g/L}$ , $n=6$ ). ....	81
<b>Tabla 2.</b> Concentración de PAHs encontrados en vegetales ( $\text{ng/Kg} \pm \text{s.d.}$ , $\text{pg/cm}^2$ , $n=3$ ), junto con los.. ....	82

## ► CAPÍTULO III

<b>Tabla 1.</b> %R y % RSD obtenidos al analizar por triplicado una de las muestras de leche infantil ( $n^{\circ}1$ ) sobrecargada con ( $\mu\text{g/Kg}$ ). ....	93
<b>Tabla2.</b> Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en muestras de leche ( $\mu\text{g/Kg}$ , $n=6$ ). ....	93
<b>Tabla 3.</b> Recuperaciones de los metabolitos estudiados, obtenidas según el tiempo de incubación en la estufa con y sin corriente de $\text{N}_2$ (%R (RSD), $n=3$ ). ....	101
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de recuperación de los metabolitos estudiados, obtenido para diferentes disolventes de elución ( $n=3$ ). ....	104
<b>Tabla 5.</b> %R y %RSD de metabolitos obtenidos al analizar por triplicado una muestra de leche ( $n^{\circ}1$ ) sobrecargada ( $\mu\text{g/Kg}$ ). ....	106

## ► CAPÍTULO IV

<b>Tabla 1.</b> %R y % RSD obtenidos al analizar cada una de las muestras de estiércol de conejo sobrecargada ( $\mu\text{g/Kg}$ ).....	115
<b>Tabla 2.</b> Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en estiércoles ( $\mu\text{g/L}$ , $n=6$ ).....	115
<b>Tabla 3.</b> Optimización de la etapa de hidrólisis enzimática del 3-OH-B[a]P en excretas de caballo ( $\mu\text{g/Kg} \pm \text{s.d.}$ ) .....	119
<b>Tabla 4.</b> Concentración de PAHs y metabolitos en excretas y estiércoles ( $\mu\text{g/kg} \pm \text{s.d.}$ , $n=2$ ), junto con los FTE.....	121
<b>Tabla 5.</b> Límites legales permisibles para PAHs ( $\text{mg/Kg}$ ) en suelos establecido enr Canadá y los Países Bajos.....	125

## ► CAPÍTULO V

<b>Tabla 1.</b> Información nutricional (por 100g de producto) y algunas de las características más relevantes de los moluscos analizados.....	131
<b>Tabla 2.</b> Límites de detección y de cuantificación para cada uno de los PAHs en moluscos bivalvos ( $\mu\text{g/Kg p.h.}$ , $n=6$ ).....	133
<b>Tabla 3.</b> Niveles de PAHs encontrados en las muestras de bivalvos ( $\mu\text{g/Kg p.h.} \pm \text{s.d.}$ , $n=2$ ) y factores de toxicidad equivalente. ....	136
<b>Tabla 4.</b> PAHs totales encontrados por diversos autores en mejillones y almejas ( $\mu\text{g/Kg}$ ).....	140
<b>Tabla 5.</b> Niveles de PAHs encontrados en la fracción lipídica del líquido de cobertura de las muestras de mejillones en escabeche ( $\mu\text{g/L p.h.}$ $n=2$ ) y factores de toxicidad equivalente.....	143

## ► CAPÍTULO VI

<b>Tabla 1.</b> Técnicas de tostado y condiciones empleadas .....	152
<b>Tabla 2.</b> %R y %RSD obtenidos al analizar por triplicado una muestra de pan comercial (muestra nº1) sobrecargada ( $\mu\text{g/Kg}$ ).....	155
<b>Tabla 3.</b> Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en pan tostado ( $\mu\text{g/Kg}$ ).....	155

<b>Tabla 4.</b> %R y %RSD obtenidos al analizar por triplicado una muestra de cenizas de pan obtenida a 300°C y 500°C sobrecargada (µg/Kg).....	157
<b>Tabla 5.</b> Niveles de PAHs encontrados en las muestras de pan comercial (µg/Kg±s.d.).....	158
<b>Tabla 6.</b> FTE y niveles de PAHs encontrados en las muestras de pan tostado en el laboratorio (µg/Kg± s.d, n=2).....	161

## ► ANEXO

<b>Tabla 1.</b> Ingredientes principales e información nutricional (por 100 g de producto) de las muestras de leche infantil analizadas..	175
<b>Tabla 2.</b> Ingredientes principales y características más relevantes de las muestras de pan tostado comercial.....	177
<b>Tabla 3.</b> Ingredientes e información nutricional (por 100 g de producto) de las muestras de cereales infantiles analizadas.....	180

## ÍNDICE DE FIGURAS

### ► INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Estructura de veinte PAHs entre los que se encuentran los quince designados por el Comité Científico de Alimentación Humana como cancerígenos (remarcados por la línea discontinua). ....	8
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los compuestos que se forman en el metabolismo del B[a]P .....	13
<b>Figura 3.</b> Formas hidroxiladas y conjugadas del B[a]P y del P. ....	14
<b>Figura 4.</b> Estructuras de las moléculas del B[a]P, Chr y la hormona 17- $\beta$ -estradiol .....	19

### ► PARTE EXPERIMENTAL

<b>Figura 1.</b> Protocolo analítico para la determinación de PAHs en muestras sólidas. ....	48
<b>Figura 2.</b> Protocolo analítico para la determinación de metabolitos de PAHs en muestras de leche y estiércoles. ....	49

### ► CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Localización de la turbera de Penido Vello en la Sierra de O Xistral.....	56
<b>Figura.2.</b> a) Momento de la toma de muestra. b) Muestra de turba recogida con una sonda Bielorrusa. ....	56
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas correspondientes a un patrón de PAHs inyectado con las condiciones de detección a las cuales presentan absorbancia el DB[a,]P y el DB[ah]A (trazo azul) y con las condiciones específicas para la cuantificación del DB[a,]P (trazo verde). ....	58
<b>Figura 4.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en muestra de turba. ....	64
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas correspondientes a una muestra de turba (nº 6) (trazo verde) y a un patrón de PAHs con un rango de concentraciones de 0,40-28 ( $\mu\text{g/L}$ ) (trazo azul).. ....	66
<b>Figura 6</b> Niveles totales de PAHs encontrados a lo largo de los 40 cm de la turbera .....	68

<b>Figura 7.</b> Distribución en profundidad de los PAHs de la turbera de Penido Vello.....	72
<b>Figura 8.</b> Porcentajes relativos de cada uno de los PAHs con respecto al total durante los periodos 1738-1990 y 1686-1075 .....	73

## ► CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Área de muestreo (Caldas de Reis-Vilanova de Arousa-Cambados) (Caldas de Reis situada a 42° 36' 11' N' 8° 38' 26" O). .....	79
<b>Figura 2.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de alimentos vegetales. ....	80
<b>Figura 3.</b> Promedio de concentraciones (ng/Kg, n=3) en los diferentes vegetales (eje x); las áreas de los círculos son proporcionales al total de PAHs en cada uno de ellos. En el eje y se representa el nivel de B[a]P (ng/Kg).....	84

## ► CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de leche infantil.....	92
<b>Figura 2.</b> Cromatograma correspondiente a un patrón de 1-OH-P (5,0 µg/L) y 3-OH-B[a]P (2,0 µg/L).....	96
<b>Figura 3.</b> Cromatogramas correspondientes a un patrón de 1-OH-P y 3-OH-B[a]P (trazo azul) y a una disolución de TBHQ incubada (37°C) con β-glucuronidasa/arilsulfatasa durante 2h (trazo verde) y 8h (trazo rojo). ....	100
<b>Figura 4.</b> Recuperación de hidroxi PAHs al pasar a través de la minicolumna de C18, una disolución de buffer:acetonitrilo en diferentes proporciones.....	102
<b>Figura 5.</b> Esquema del protocolo analítico para la determinación de 1-OH-P y 3-OH-B[a]P en leches infantiles. ....	105

## ► CAPÍTULO IV

<b>Figura 1.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs nativos en excretas y estiércoles animales. ....	114
<b>Figura 2.</b> Esquema del protocolo para la determinación de metabolitos en excretas y estiércoles animales.....	117

<b>Figura 3.</b> Cromatogramas correspondientes a una muestra de excreta de caballo y a un patrón de 1-OH-P (5,0 µg/L) y 3-OH-B[a]P (2,0 µg/L). ....	118
--	-----

<b>Figura 4.</b> Cromatograma correspondiente a un patrón de 1-OH-P y 3-OH-B[a]P mediante LC-MS/MS en modo negativo .....	120
---	-----

## ► CAPÍTULO V

<b>Figura 1.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de bivalvos. ....	132
--	-----

<b>Figura 2.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en la fracción lipídica del líquido de cobertura [Vázquez-Troche y col., 2000]. ....	134
---	-----

<b>Figura 3.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en la fracción acuosa del líquido de cobertura [García-Falcón y col., 2004]. ....	134
--	-----

<b>Figura 4.</b> Concentraciones en (µg/kg p.h.) de PAHs en las muestras de moluscos bivalvos analizadas. ....	139
--	-----

<b>Figura 5.</b> Promedio de PAHs totales para las diferentes muestras de moluscos bivalvos (µg/kg p.h.). ....	141
--	-----

## ► CAPÍTULO VI

<b>Figura 1.</b> Pan tostado mediante diferentes técnicas: (a) horno eléctrico a 200°C, (b) tostadora, (c) horno de gas, (d) brasa de carbón, (e) brasa de roble, (f) llama de gas, (g) llama de roble. ....	151
--	-----

<b>Figura 2.</b> Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de pan tostado y cereales infantiles. ....	154
---	-----

<b>Figura 3.</b> Concentraciones en (µg/kg) de PAHs en las muestras de pan tostado en el laboratorio en presencia de llama de roble, con y sin contacto con humo (envuelto). ....	163
---	-----

<b>Figura 4.</b> Concentraciones de PAHs en las muestras de pan tostado en el laboratorio (µg/Kg): (A) tostado a la brasa de carbón y roble; (B) tostado con llama de gas y roble. ....	164
---	-----

<b>Figura 5.</b> Cromatogramas correspondientes a una muestra de pan tostado a la llama viva con madera de roble (trazo verde), a una muestra de pan tostado en tostadora (trazo rosa) y a un patrón de PAHs con un rango de concentraciones entre 14 µg/L, para el B[ghi]P, y 0,20 µg/L para el B[k]F. ....	165
--	-----





## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

AcEt	Acetato de etilo
AcN	Acetonitrilo
ACS	Sociedad Americana de Química
ASE	Extracción acelerada con disolvente
col.	Colaboradores
DCM	Diclorometano
em.	Emisión
ex.	Excitación
FD	Fluorescencia
FTE	Factor de toxicidad equivalente
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICPS	Programa Internacional sobre Seguridad Química
LC	Cromatografía líquida
MetOH	Metanol
MS	Masas
nc	No cuantificable
nd	No detectable
n-hex	Hexano
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
p.h.	Peso húmedo
PM	Peso molecular
p.s.	Peso seco
Pto.fus.	Punto de fusión
PVO	Penido Vello
%R	Porcentaje de recuperación
RSD	Porcentaje de desviación estándar relativa
s.	Siglo
s.d.	Desviación estándar
Sol.	Solubilidad
TBHQ	Ter-butil-hidroquinona
TR	Tiempo de retención
US EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
$\bar{x}$	Promedio



## **Justificación y Objetivos**

---



Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son contaminantes orgánicos que se caracterizan por la fusión de dos o más anillos aromáticos en su estructura, siendo muchos de ellos potentes cancerígenos y/o mutagénicos. Los PAHs están presentes de forma natural en el crudo del petróleo, carbón, alquitrán y diferentes productos de refinería, aunque también se pueden generar por la combustión incompleta de estos combustibles fósiles o de cualquier otro tipo de materia orgánica. Por ello, se pueden encontrar PAHs en humos procedentes de fuentes naturales (actividad volcánica, incendios forestales espontáneos, etc.) o antropogénicas (centrales térmicas, calderas de calefacción industrial, combustión de residuos, emisiones de vehículos de transporte, etc.). La segunda, constituye la principal fuente de contaminación del medio aéreo. Gracias a su relativa volatilidad o a su capacidad de adsorción a las partículas atmosféricas, los PAHs se transportan a través del aire, pudiendo ser depositados en lugares remotos a gran distancia de la fuente emisora.

Las turberas son un excelente medio para el estudio de contaminantes orgánicos hidrófobos. Su alto contenido en materia orgánica facilita la adsorción de estos residuos, minimizando su movilidad o alteración tras la deposición. A diferencia de los suelos y sedimentos, las turbas no están sometidas a continuos cambios como consecuencia de la actividad microbiana. De este modo, las turberas permanecen inalteradas cientos o miles de años, ofreciendo así la oportunidad de construir registros de los niveles de contaminantes asociados a los cambios ambientales.

La contaminación de los alimentos puede producirse tanto en origen, como durante su manipulación y/o procesado. La deposición atmosférica de los PAHs junto con su migración a partir de suelos o fertilizantes contaminados, se consideran las principales fuentes de contaminación de los alimentos vegetales. La alimentación constituye la principal vía de incorporación de PAHs a los animales productores de alimentos. Es de destacar que en estos productos, como la leche o algunos organismos acuáticos, no sólo resulta de interés la determinación de PAHs nativos, sino también la de los productos resultantes de su metabolización, igualmente tóxicos. Los tratamientos térmicos severos a los que se someten algunos alimentos durante su procesado industrial (tostado, secado, etc.) pueden contribuir de igual forma, a aumentar su carga final de PAHs.

Los objetivos de este trabajo se centrarán en evaluar la contaminación medioambiental y alimentaria por PAHs y sus metabolitos. Para ello la Tesis Doctoral se ha estructurado en seis capítulos:

- **Capítulo I:** El objetivo de este capítulo consistirá en la evaluación de la contaminación ambiental durante los últimos 1000 años. Para ello, se analizará una turbera a distintos niveles de profundidad, ubicada en la sierra de O Xistral (Lugo).

- **Capítulo II:** La deposición atmosférica como fuente de contaminación de vegetales, se estudiará mediante el análisis de diferentes productos hortofrutícolas expuestos a los humos generados en el incendio de una industria química, situada en Caldas de Reis (Pontevedra).
- **Capítulo III:** La posible transferencia de PAHs nativos y de los productos resultantes de su metabolización a la leche, se estudiará analizando diferentes muestras de fórmulas lácteas infantiles de venta y consumo en nuestro país. Se verificará, además, la adecuación de los niveles de estos contaminantes a la normativa vigente.
- **Capítulo IV:** En esta sección se determinará el contenido de PAHs y sus metabolitos en excretas de distintos animales, con el fin de aportar información sobre el nivel de contaminación al que han estado expuestos. También se comprobará su viabilidad para ser empleados como abonos orgánicos.
- **Capítulo V:** Se chequearán el contenido de PAHs en diferentes moluscos bivalvos enlatados procedentes de las rías gallegas, con el fin de comprobar si los niveles se ajustan a los requisitos legales. Se completará el ensayo estudiando la posible migración de estos residuos al líquido de cobertura (agua o aceite) del producto.
- **Capítulo VI:** Por último, se evaluará cómo contribuye el tostado, industrial y doméstico, a la contaminación de alimentos ricos en hidratos de carbono, como el pan y los cereales infantiles.

## Introducción







# 1. LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

## 1.1. CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) constituyen una familia de más de 100 compuestos orgánicos diferentes formados por dos o más anillos bencénicos y en algunos casos un anillo pentagonal, con o sin sustituyentes sobre sus átomos de carbono e hidrógeno [**Katiyar y col., 1993**]. La abundancia de estos compuestos en el medio ambiente, unido a su carcinogenicidad, los ha situado en las listas de polucionantes orgánicos prioritarios.

Los PAHs pertenecen al grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) ya que, de acuerdo con el protocolo de Contaminantes Orgánicos Persistentes firmado el 24 de junio de 1998 en Dinamarca, reúnen las cinco características fundamentales: (i) ser tóxicos, (ii) persistentes, (iii) bioacumulables, (iv) ser transportados a través del aire y depositados a largas distancias, y (v) causar efectos negativos sobre la salud y el medioambiente tanto cerca, como lejos de su fuente emisora [**Chahin y col., 2008**].

Los PAHs son sustancias lipofílicas, tendencia que se incrementa con el aumento de su masa molecular, e inestables fotoquímicamente, por lo que se degradan con la luz (proceso de fotooxidación) [**Albers, 1995**]. Bajo la influencia de la luz del sol o de una fuente artificial de luz UV, y en presencia de oxígeno, ozono u otros oxidantes, los PAHs reaccionan a peróxidos intracíclicos [**Gadzala y Buszewski, 1995**].

La fluorescencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos está relacionada con la presencia de orbitales  $\pi$ -enlazantes de alta energía y de orbitales  $\pi^*$ -antienlazantes de energía inferior. La transición electrónica entre ambos tipos de orbitales es la que origina el color y espectros característicos de absorción UV y de fluorescencia [**Shawn y Connel, 1994**].

En la **Figura 1** se muestra la estructura de algunos PAHs, con dos, tres cuatro, cinco y seis anillos aromáticos. Entre estos PAHs se encuentran los 15 seleccionados por el Comité Científico de la Alimentación Humana, como posibles residuos cancerígenos en alimentos: Benzo[a]antraceno (B[a]A), Criseno (Chr), 5-Metilcriseno (5-MChr), Benzo[j]fluoranteno (B[j]F), Benzo[b]fluoranteno (B[b]F), Ciclopenta[cd]pireno (CPP), Benzo[k]fluoranteno

---

**Katiyar, S.K.; Agarwal, R.; Mukhtar, H., 1993.** CRC Handbook of Chromatography: Liquid chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. Eds. Rathore, H.S. and Sherma, J., CRC Press, Boca Raton, Florida.


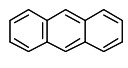
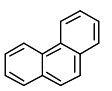
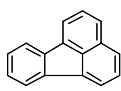
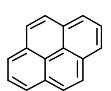
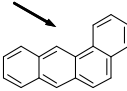
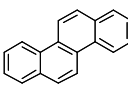
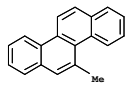
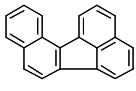
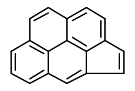
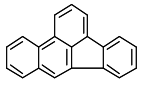
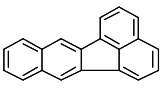
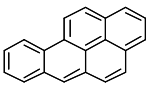
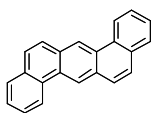
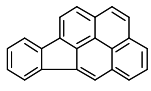
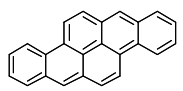
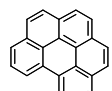
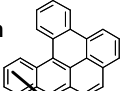
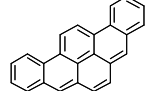
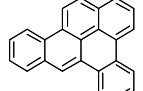
**Chahin, A.; Guivarc'h, Y.P.; Dziurla, M.A.; Toussaint, H.; Feidt, C.; Rychen, G., 2008.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, 56, 1780-1786.

**Albers, P.H., 1995.** Handbook of Ecotoxicology. Eds. Hoffman D.J. y col., Lewis Publishers, Boca Raton, 330-355.

**Gadzala, R.M.; Buszewski, B., 1995.** Polish Journal of Environmental. Studies, 4(1), 5-15.

**Shaw, G.R.; Connel, D.W., 1994.** Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 135, 1-62.

(B[k]F), Benzo[a]pireno (B[a]P), Dibenzo[a,h]antraceno (DB[a,h]A), Indeno[123-cd]pireno (I[1,2,3-cd]P), Dibenzo[a,h]pireno (DB[a,h]P), Dibenzo[a,i]pireno (DB[a,i]P), Dibenzo[a,j]pireno (DB[a,j]P), Dibenzo[a,e]pireno (DB[a,e]P) y Benzo[ghi]perileno (B[ghi]P) [European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002]. De todos ellos, el B[a]P es, sin duda, el más estudiado e históricamente usado como marcador del grupo en el medio ambiente y en los alimentos, debido a su abundancia y a sus efectos tóxicos. De los cinco compuestos restantes (Naftaleno (Na); Fenantreno (Phe); Antraceno (An); Fluoranteno (F) y Pireno (P)), no hay claras evidencias de que posea propiedades genotóxicas o cancerígenas, pero son elementos muy abundantes en el medio ambiente.

 Naftaleno	 Antraceno	 Fenantreno	 Fluoranteno	 Pireno
Región Bahía  Benzo[a]antraceno	 Chryseno	 5-Metilchry seno	 Benzo[j]fluoranteno	 Ciclopenta[cd]pireno
 Benzo[b]fluoranteno	 Benzo[k]fluoranteno	 Benzo[a]pire no	 Dibenzo[a,h]antraceno	 Indeno[1,2,3-cd]pireno
 Dibenzo[a,h]pireno	 Benzo[gh i]perileno	Región Fiordo  Dibenzo[a,i]pireno	 Dibenzo[a,j]pireno	 Dibenzo[a,e]pireno

**Figura 1.** Estructura de veinte PAHs entre los que se encuentran los quince designados por el Comité Científico de Alimentación Humana como cancerígenos (remarcados por la línea roja).

## 1.2. SÍNTESIS

El origen de los PAHs en el medio ambiente es muy diverso, pudiendo diferenciar básicamente entre fuentes petrogénicas y pirolíticas.

- Origen petrogénico:

La materia orgánica sufre una serie de reacciones geoquímicas durante la síntesis, in situ, de combustibles orgánicos fósiles como el carbón y el petróleo. Como resultado de estas reacciones se generan elevadas cantidades de PAHs [**Marcé y Borrull, 2000**].

- Origen pirolítico:

Los PAHs pueden proceder de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, ya sea esta combustión debida a causas naturales o antropogénicas. Como consecuencia de las elevadas temperaturas se generan radicales libres que reaccionen entre sí, formando compuestos con estructuras cíclicas condensadas.

La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales espontáneos y la actividad volcánica [**Harvey, 1997**], es mínima comparada con las emisiones causadas por el ser humano. Así, son fuentes principales de PAHs, el tráfico intenso de vehículos, las calefacciones domésticas o las plantas industriales que dependen de la combustión de derivados del petróleo y del carbón.

Aunque su repercusión ambiental es casi insignificante, el hombre también genera cantidades importantes de PAHs en diferentes actividades sociales, entre los que se encuentran el humo de tabaco, y procesos tecnológicos de los alimentos: ahumados, a la parrilla y los sometidos a tratamientos térmicos severos. En general, la tasa de formación de estos compuestos en los alimentos, depende del tipo de combustible y de las condiciones de combustión (temperatura, accesibilidad de oxígeno, presencia o ausencia de llama, etc.).

---

**Marcé, R.M.; Borrull, F., 2000.** Journal of Chromatography A, 885, 273-290.

**Harvey, R.G., 1997.** Polycyclic aromatic hydrocarbons. Ed. Wiley-VCH, Inc., Chicago, 1-350.

## 2. METABOLISMO DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

La concentración de PAHs no parece incrementarse a medida que se asciende en la cadena trófica (no sufren, por tanto, el fenómeno de biomagnificación) en parte, debido a la mayor capacidad metabolizadora de los depredadores superiores.

En las últimas décadas se ha realizado un progreso significativo en el estudio de la acción biológica y destino en el organismo de los PAHs. La capacidad de metabolización de los PAHs está ampliamente distribuida en el reino animal, pero suele ser mayor en los organismos superiores. El principal objetivo de la metabolización de los PAHs, consiste en aumentar la polaridad de estos compuestos para convertirlos en sustancias más hidrosolubles y más fáciles de excretar. Aunque este metabolismo produce en su mayor parte una desintoxicación, hay algunos PAHs que se activan a especies más reactivas que pueden llegar a unirse al ADN provocando mutaciones genéticas [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**].

### 2.1. VÍAS DE EXPOSICIÓN

Los alimentos, el agua y el aire son las principales vías de exposición de los mamíferos a los PAHs [**OPS, 1985**]. El agua representa entre el 0,10 y el 0,30 % de esta exposición, mientras que la contribución del aire es del 0,90 %. Los alimentos contribuyen con un 99%.

### 2.2. ABSORCIÓN

La tasa de absorción de los PAHs en el tracto gastro-intestinal depende, por una parte, de la especie animal de que se trate, y por otra de las características físico-químicas del compuesto, tales como su peso molecular, coeficiente de reparto octanol-agua o capacidad de adsorción a la materia orgánica.

Los estudios realizados sobre ratas [**Van Schooten y col., 1997**], demuestran que en esta especie animal los PAHs (An, P y B[a]P) se absorben

---

**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002.** Opinion of the science committee on food on the risk to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

**OPS (Organización Panamericana de la Salud), 1985.** Guías para la calidad del agua potable, vol.1. Recomendaciones. Washington, D.C. (Publicación Científica N°481).

**Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

en una elevada proporción y a gran velocidad, tras ser administrados oralmente. Este resultado se pone de manifiesto al comprobar que, tras la administración de los PAHs, tan sólo se encuentran niveles detectables de estos compuestos sin metabolizar, en las heces de los animales. Estos mismos autores también comprobaron cómo afecta a la absorción, el medio en el que se dosifican los PAHs a las ratas. Si los PAHs se suministran oralmente a través de vehículos con elevados niveles de materia orgánica, como por ejemplo suelos contaminados, la tasa de absorción es menor que si se aportan en disolución. Así, el porcentaje de B[a]P en las heces, pasa del 0,30 al 1,0 % si se suministra a través de suelos con alto contenido en carbono, y en el caso del P del 0,20 al 0,50 %. Este comportamiento sugiere que la capacidad de los PAHs a ligarse a la materia orgánica, reduce su biodisponibilidad gastrointestinal. Los ensayos realizados en rumiantes, como vacas o cabras, son más limitados [**Grova y col., 2002 y 2006; Lutz y col., 2006**]. Dichos autores estudiaron, en cabras, las cinéticas de excreción de PAHs (Phe, P y B[a]P) marcados radiactivamente en leche, orina y heces. Los resultados demuestran que de todos los PAHs estudiados, el B[a]P es el que se absorbe en menor grado, ya que tras su administración oral, el 88 % del compuesto se detectó en las heces del animal. Aún así, es de destacar que el uso de PAHs radiactivos, no permite saber si los compuestos están en forma nativa o en forma de metabolitos. Por ello, podría darse el caso de que el B[a]P fuese absorbido y metabolizado, retornando posteriormente a las heces mediante circulación entero hepática.

### 2.3. DISTRIBUCIÓN Y METABOLIZACIÓN

Una vez absorbidos, los PAHs se distribuyen por vía sanguínea a una gran variedad de tejidos, con una particular implicación a localizarse en el tejido adiposo, debido a su carácter lipofílico. De todas formas, esta tendencia no es muy manifiesta debido a su rápido metabolismo a nivel de los microsomas. Como ya se ha comentado anteriormente, el principal objetivo de la metabolización de los PAHs, se centra en aumentar la polaridad de estos compuestos para convertirlos en sustancias más hidrosolubles y más fáciles de excretar por vía fecal y urinaria. Aunque este metabolismo produce en su mayor parte una desintoxicación, hay algunos PAHs que se activan a especies más reactivas que pueden llegar a unirse al ADN y también a la hemoglobina, produciendo así mutaciones que finalmente evitan que las células se reproduzcan normalmente y teniendo la capacidad de generar tumores.

---

Grova, N.; Feidt, C.; Laurent, C.; Rychen, G., 2002. *International Dairy Journal*, 12, 1025-1031.

Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C., 2006. *Agronomy for Sustainable Development*, 26, 195-199.

Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 263-268.

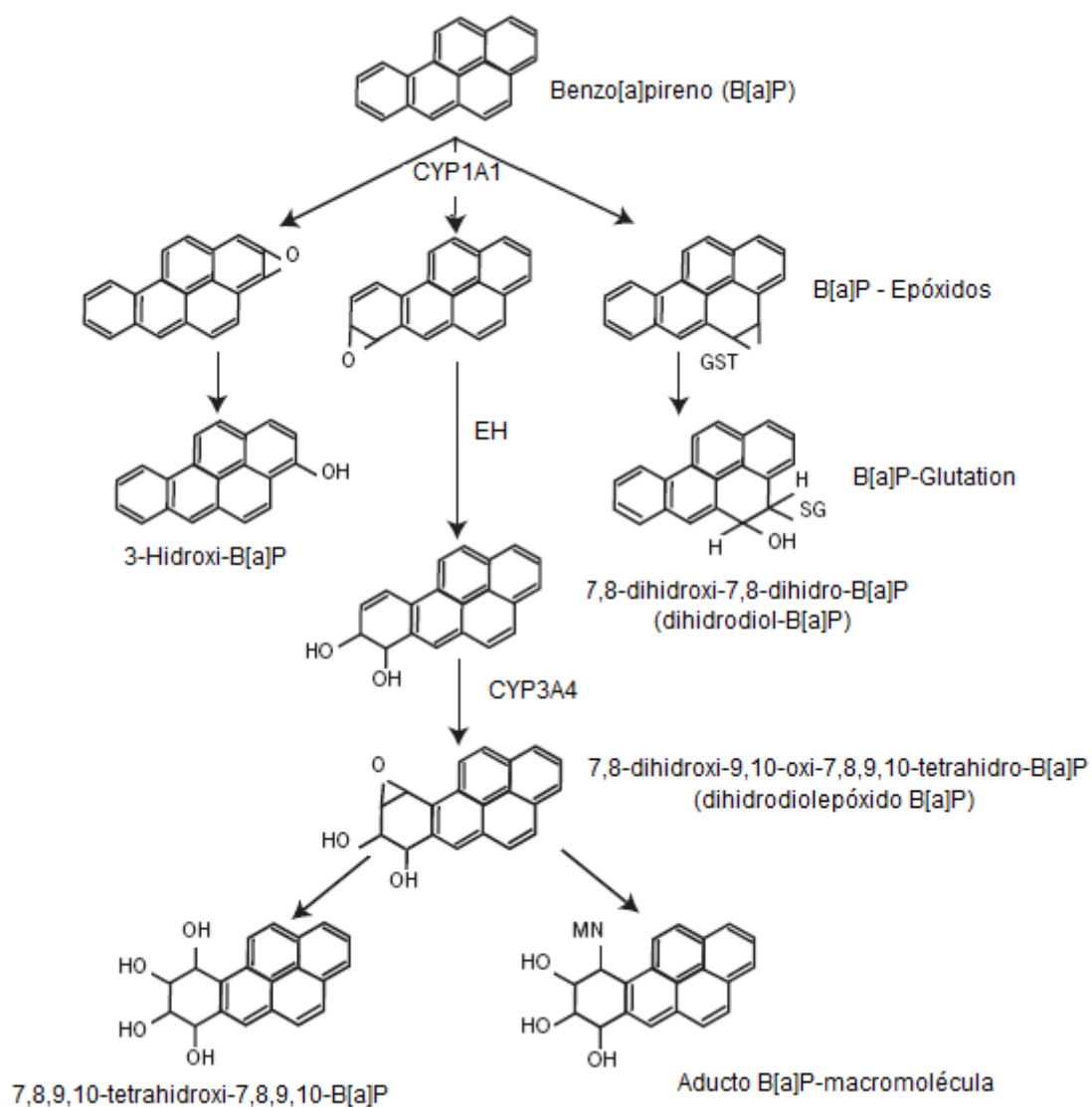
Las rutas metabólicas de los xenobioticos lipofílicos (incluidos los PAHs), se pueden dividir en dos categorías principales: *reacciones de primera fase (biotransformación)* y *reacciones de segunda fase (conjugación)*. Las **reacciones de primera fase** incluyen oxidaciones, hidroxilaciones, y reducciones, en las que se introduce un nuevo grupo funcional, haciendo la molécula más polar y, por lo tanto, excretable con mayor facilidad. En este proceso intervienen un grupo de enzimas denominadas “Mixed Function Oxidases” (MFO) que pertenecen al grupo citocromo P-450 (CYP 450). Actualmente se conocen en los seres vivos 18 familias y 42 subfamilias de CYP 450, la mayoría de ellas localizadas en el hígado aunque existen isoformas extrahepáticas en numerosos tejidos como en el intestino, riñón, cerebro, linfocitos, etc. De hecho hay estudios que verifican que especialmente los PAHs con elevado peso molecular, y para facilitar su absorción a nivel intestinal, son previamente metabolizados en esta mucosa intestinal, es decir, que ya pasan al torrente sanguíneo como metabolitos. Las **reacciones de segunda fase** consisten en la síntesis de conjugados, mediante la adición enzimática de nuevos grupos, como ácido sulfúrico o ácido glucurónico, a un grupo funcional ya presente en la molécula o a uno puesto en la fase I. Para ello intervienen las enzimas glutathione-S-transferase o la sulfotransferase, localizadas principalmente en el hígado. De esta manera se incrementa todavía más la polaridad de la sustancia.

De todos los PAHs, son sin duda las rutas metabólicas del B[a]P y del P las que mejor se conocen. En la **Figura 2** se puede apreciar un esquema de la ruta del B[a]P [**Mastandrea y col., 2005**]. Estos compuestos pueden ser biotransformados en humanos y animales a numerosos metabolitos de fase I (**Figura 2**) incluyendo el 1, 3, 7 y 9-hidroxi B[a]P y P, B[a]P dihidrodioles, B[a]P dihydrodiol-epóxidos y B[a]P-quinonas [**Sugihara y James, 2003**]. De todos ellos, el 3-hidroxi-B[a]P (3-OH-B[a]P) y el 1-hidroxipireno (1-OH-P), son los metabolitos mayoritarios del B[a]P y del P, respectivamente, en muchas especies animales, incluyendo los humanos, ratones, ratas, peces y rumiantes. En la **Figura 3** se muestran las formas conjugadas de estos compuestos (glucurónico y sulfato éster) además de las hidroxiladas.

---

Mastandrea, C.; Chichizola, C.; Ludueña, B.; Sánchez, H.; Álvarez, H.; Gutiérrez, A., 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 39, 27-36.

Sugihara, N.; James, M.O., 2003. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17(4), 239-247.



**Figura 2.** Representación esquemática de los compuestos que se forman en el metabolismo del B[a]P.

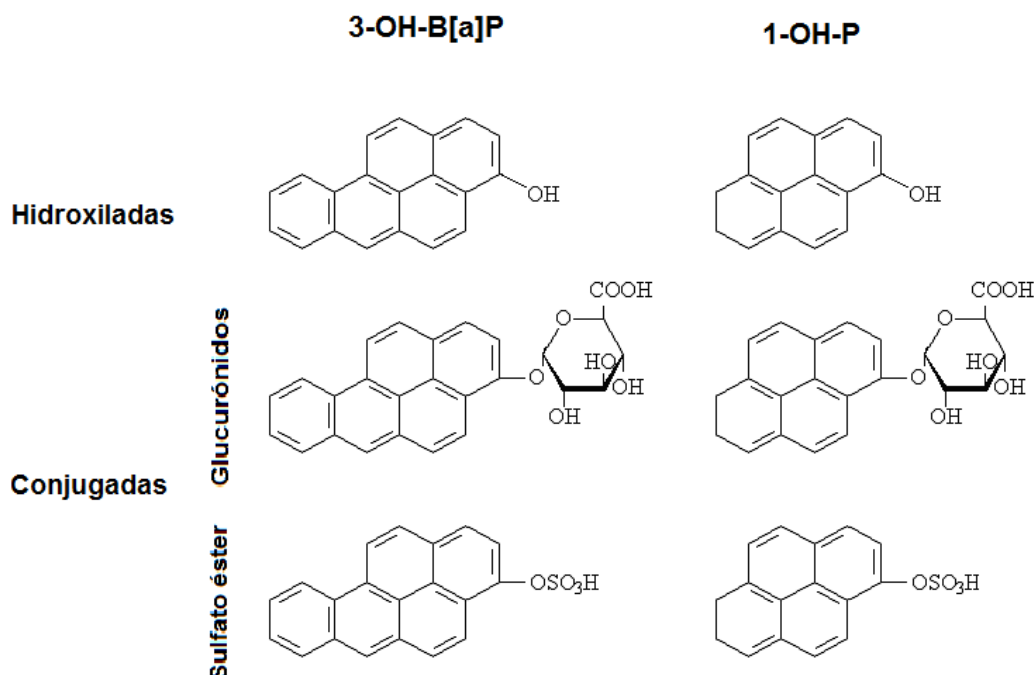


Figura 3. Formas hidroxiladas y conjugadas del B[a]P y del P.

## 2.4. EXCRECIÓN

La excreción es la fase final de la eliminación de los xenobióticos o de sus productos biotransformados del organismo. Las rutas de eliminación mayoritarias del cuerpo para cualquier molécula son la orina y las heces. Menos cantidades pueden ser eliminadas por el sudor, saliva, lágrimas o leche. Los xenobióticos tomados oralmente, pueden no ser absorbidos y ser eliminados directamente por las heces.

La presencia en orina de 1-OH-P, producto de degradación metabólica del P, se utiliza como bioindicador de exposición al total de PAHs, especialmente en trabajadores de diversas industrias: hornos de coque, plantas de aluminio, petroquímicas, etc., los cuales están expuestos a importantes emisiones de estos contaminantes [Petry y col., 1996; Lafontaine y col., 2000; Jongeneelen, 2001]. El P, si bien no es cancerígeno y sus efectos genotóxicos son limitados, es un compuesto que está presente en grandes concentraciones en el medio ambiente, lo que conlleva a que sus metabolitos también sean los que se encuentren en mayores niveles en la orina. Este es el principal motivo por el que el 1-OH-P es habitualmente elegido como bioindicador.

Petry, T.; Schmid, P.; Schlatter, C., 1996. The Annals Occupational Hygiene, 40, 345-357.

Lafontaine, M.; Payan, J. P.; Delsaut, P.; Morele, Y., 2000. The Annals of Occupational Hygiene, 44,89-100.

Jongeneelen, F.J., 2001. The Annals of Occupational Hygiene, 45, 3-13.



El 1-OH-P puede utilizarse también como bioindicador en animales productores de alimentos. Su determinación en orina, heces o leche proporciona información de la contaminación a la que está expuesta la cabaña ganadera [**Chahin y col., 2008**].

#### 2.4.1. Excreción de metabolitos a través de heces y orina

Los ensayos realizados con ratones, demuestran que tras la metabolización, la mayor parte de los PAHs se eliminan por vía urinaria y fecal. En el estudio realizado por **Van Schooten y col., 1997**, del total del P suministrado a las ratas oralmente en forma de disolución, se recupera aproximadamente el 21 %, el 17 % se encuentra en las heces en forma de 1-OH-P, y el 4,0 % restante en la orina. En el caso del B[a]P, tan sólo se recupera el 8,3 % del total. El 0,30 % se elimina sin inalterar en heces, el 8,0 % restante se encuentra como metabolito [3-OH-B[a]P] también en las heces. En este caso, en la orina no se detectan trazas del analito. En un trabajo similar realizado por **Hecht y col., 1979** (recogido por **Van Schooten y col., 1997**), se comprueba que del total de B[a]P suministrado oralmente a ratas, se recupera un 74-79 % en las heces, del cual, tan sólo el 5,6–13 % se encuentra sin metabolizar. **Grova y col., 2002**, comprobó que en cabras a las que se le dosifica PAHs oralmente, la mayor parte se excreta por vía urinaria (el 40 % y el 11 % del total para el fenantreno y pireno, respectivamente). **Ferrari y col., 2001**, analizaron 1-OH-P en orina de vacas de zonas rurales y urbanas y observaron un incremento significativo de la concentración de este analito en las vacas que vivían próximas a las autopistas (8,6 µg/L).

#### 2.4.2. Excreción de metabolitos a través de la leche

Hasta la fecha diversos autores [**Grova y col., 2002**] han demostrado que los metabolitos de diferentes xenobióticos, como las dioxinas, se transfieren en elevadas proporciones a la leche de los rumiantes, constituyendo un problema de seguridad alimentaria. La eliminación de los metabolitos de PAHs a través de la leche ha sido poco estudiada hasta el momento [**Grova y col., 2002 y 2006; Lutz y col., 2006; L. Zanieri y col., 2007; Chahin y col.,**

---

**Chahin, A.; Guivarc'h, Y.P.; Dziurla, M.A.; Toussaint, H.; Feidt, C.; Rychen, G., 2008.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 1780-1786.

**Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

**Hecht, S.S., 2002.** Carcinogenesis, 23, 907-922.

**Grova, N.; Feidt, C.; Laurent, C.; Rychen, G., 2002.** International Dairy Journal, 12(12), 1025-1031.

**Ferrari, St.; Mandel, F.; Berset, J.D., 2001.** Chemosphere, 47, 173-182.

**Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C., 2006.** Agronomy for Sustainable Development, 26, 195-199.

**Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

**Zanieri, L.; Galvan, P.; Checchini, L.; Cincinelli, A.; Lepri, L.; Donzelli, G.P.; Del Bubba, M., 2007.** Chemosphere, 67, 1265-1274.

**2008]**. Según recoge **Bulder y col., 2006**, el grado de transferencia del B[a]P nativo a la leche de oveja, después de su administración oral crónica (1,0 mg/Kg por día), tan sólo rondaba el 0,010 %. **Grova y col., 2002**, realizaron un estudio administrando una única dosis oral de Phe, P y B[a]P, marcados radiactivamente, a cabras lactantes. Los porcentajes de transferencia a la leche fueron del 1,5, 1,9 y 0,20 %, respectivamente. Pero el uso de PAHs radiactivos en este estudio, no permitió saber si los compuestos transferidos lo eran en forma nativa o en forma de metabolitos.

Posteriormente estos mismos autores [**Grova y col., 2006**], evaluaron el impacto de una exposición oral crónica de PAHs (An, Phe, F, P, Chr, B[k]F, B[a]P y B[ghi]P) en cabras lactantes, durante 28 días. En este trabajo sí se determinó por separado los PAHs nativos y sus respectivos metabolitos. Los resultados verificaron que prácticamente el 100 % de los PAHs transferidos a la leche lo hacen en forma de metabolitos, comportamiento que también fue confirmado por **Lutz y col., 2006**, en un ensayo realizado con vacas. Una conclusión semejante se puede extraer del trabajo realizado por **Grova y col., 2000**, al determinar el contenido de PAHs en muestras de leche procedentes de zonas rurales muy aisladas y de zonas industrializadas. Los niveles de estos residuos fueron no detectables en ambos tipos de muestras. Todos estos ensayos sugieren que el habitual análisis de PAHs basado en la detección de moléculas nativas, no es representativo de la contaminación real de alimentos de origen animal.

### 3. TOXICIDAD DE LOS PAHs Y SUS METABOLITOS

Diversos ensayos de experimentación con animales y resultados obtenidos in vivo e in vitro, manifiestan que muchos de estos PAHs tienen claras propiedades genotóxicas y/o mutagénicas. Las características estructurales de los PAHs que se relacionan con su potencial carcinogénico son la forma y el tamaño de las moléculas y la presencia o ausencia de sustituyentes en determinadas regiones del anillo bencénico. De acuerdo con el

---

**Chahin, A.; Guivarc'h, Y.P.; Dziurla, M.A.; Toussaint, H.; Feidt, C.; Rychen, G., 2008.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 1780-1786.

**Bulder, A.S.; Hoogenboom, L. A. P.; Kan, C. A.; Raamsdonk, L. W. D.; Bouwmeester, H., 2006.** Initial risk assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in feed (materials). Institute of Food Safety, Netherlands. [http://library.wur.nl/file/wurpubs/LUWPUBRD\\_00352428\\_A502\\_001.pdf](http://library.wur.nl/file/wurpubs/LUWPUBRD_00352428_A502_001.pdf).

**Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C., 2006.** Agronomy for Sustainable Development, 26, 195-199.

**Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

**Grova, N.; Laurent, C.; Feidt, C.; Rychen, G.; Laurent, F.; Lichtfouse, E., 2000.** European Journal of Mass Spectrometry, 6 (5), 457-460.

informe de la **Comisión del Codex Alimentarius, 2004**, todos los PAHs con propiedades tóxicas se caracterizan por poseer en su estructura, una región “bahía” o “fiordo”, ya que los convierte en sustancias altamente reactivas (**Figura 1.**).

También hay estudios epidemiológicos que ponen de manifiesto un incremento de la incidencia de cánceres ocupacionales en aquellos sujetos expuestos a mezclas de PAHs. Así se ha demostrado que los trabajadores de hornos de coque, desarrollan cáncer de piel. Otras exposiciones a PAHs, como lo es el humo del tabaco o la ingestión de grandes cantidades de alimentos ahumados, también se asocian con una mayor incidencia de cáncer de pulmón o estómago [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**].

Estos compuestos están incluidos en las listas de sustancias tóxicas peligrosas, elaboradas por diferentes organismos interesados por la salud, tales como la ATSDR (Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades), IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) o la US EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos). En concreto esta última organización, hace alusión a 16 de estos contaminantes, como representantes de todo el grupo en muestras medioambientales (Naftaleno, Acenaftaleno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo[ah]antraceno, benzo[ghi]perileno, Indeno[1,2,3-c,d]pireno) [**US EPA, 1984**].

En el Programa Internacional sobre Seguridad Química, celebrado en Ginebra el año 1998 [**IPCS, 1998**], se incorporaron a esta lista 17 PAHs más (33 PAHs en total). De los 33 PAHs contemplados, hay claras evidencias de que 15 son mutagénicos y/o cancerígenos. Para el resto de los compuestos, los resultados no son del todo concluyentes.

Teniendo en cuenta que cada uno de los PAHs tiene diferentes grados de toxicidad, para poder expresar la toxicidad global de una mezcla de estos compuestos, se ha creado el concepto de “equivalentes tóxicos”. El método del equivalente tóxico otorga un valor de toxicidad (factor de equivalencia tóxica) a cada PAH, tomando como estándar el B[a]P, al que se le asigna un valor de

---

**Codex Alimentarius Commission (CX/FAC 05/37/34), October 2004.** Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on food additives and contaminants. Discussion paper on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination.

**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002.** Opinion of the science committee on food on the risk to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

**US EPA, 1984.** Review and evaluation of the evidence for cancer associated with air pollution. EPA-450/5-83-006R, U.S. Environ. Protection Agency, Arlington.

**IPCS, 1998.** Selected non-heterocyclic PAHs. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva.

referencia igual a 1,0. En la **Tabla 1** se recogen los factores de toxicidad equivalentes de algunos PAHs de acuerdo con **Nisbet y LaGoy., 1992**.

**Tabla 1.** Factor Equivalente de Toxicidad para varios PAHs.

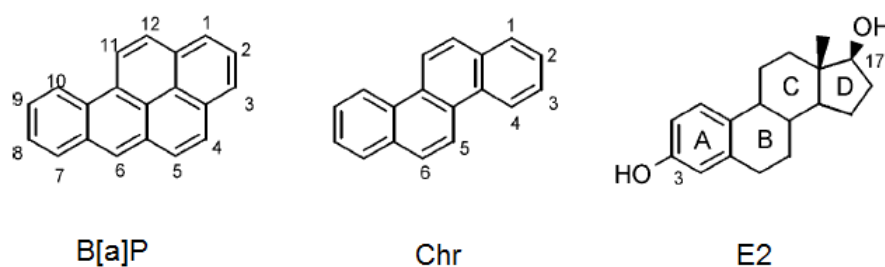
PAHs	FTE
Acenafteno	0,0010
Acenaftileno	0,0010
Antraceno	0,010
Benzo[a]antraceno	0,10
Benzo[a]pireno	1,0
Benzo[b]fluoranteno	0,10
Benzo[ghi]perileno	0,010
Benzo[k]fluoranteno	0,10
Criseno	0,010
Dibenzo[a,h]antraceno	5,0
Fluoranteno	0,0010
Fluoreno	0,0010
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,10
Fenantreno	0,0010
Pireno	0,0010

Existen diversos estudios que demuestran que algunos PAHs como el B[a]P o el Chr, pueden actuar como disruptores endocrinos [Van Lipzig y col., 2005]. Los disruptores endocrinos son sustancias químicas que debido a su similitud estructural con las hormonas de los seres vivos, pueden interferir en el funcionamiento del sistema endocrino, mediante alguno de estos tres mecanismos: suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción o aumentando o disminuyendo sus niveles. En la **Figura 4** se muestra la similitud estructural del B[a]P y del Chr con la hormona 17- $\beta$ -estradiol. Muchas poblaciones animales han sido afectadas ya por los disruptores endocrinos. Entre las repercusiones Figuran la disfunción tiroidea en aves y peces; la disminución de la fertilidad en aves, peces y tortugas o la demasculinización y feminización de peces, aves y mamíferos machos.

---

Nisbet, I.C.; LaGoy, P.K., 1992. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 16, 290-300.

Van Lipzig, M.M.H., Vermeulen, N.P.E., Gusinu, R., Legler, J., Frank, H., Seidel, A., Meerman, J.H.N., 2005. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19, 41-55.



**Figura 4.** Estructuras de las moléculas del B[a]P, Chr y la hormona 17-β-estradiol.

En los seres humanos, los efectos más preocupantes de los disruptores endocrinos, ocurren en hijas e hijos de madres expuestas durante el embarazo y la lactancia. Entre los posibles efectos sobre la salud, se encuentra el aumento de los casos de cáncer de testículo y de endometriosis, una dolencia en la cual el tejido que normalmente recubre el útero se desplaza misteriosamente al abdomen, los ovarios, la vejiga o el intestino, provocando crecimientos que causan dolor, copiosas hemorragias, infertilidad y otros problemas. El signo más espectacular y preocupante de que los disruptores endocrinos pueden haberse cobrado ya un precio importante, se encuentra en los informes que indican que la cantidad y movilidad de los espermatozoides de los varones ha caído en picado en el último medio siglo. En España se ha pasado de una media de 336 millones de espermatozoides por eyaculación en 1977 a 258 millones en 1995. La exposición prenatal a sustancias químicas imitadoras de hormonas puede estar exacerbando también el problema médico más común que afecta a los hombres al envejecer: el crecimiento doloroso de la glándula prostática, que dificulta la excreción de orina y a menudo requiere intervención quirúrgica. Los estudios con animales sugieren también una vinculación entre las sustancias químicas disruptoras endocrinas y varios problemas de reproducción en las mujeres, especialmente abortos y embarazos ectópicos. Pero la tendencia sanitaria más alarmante con diferencia para las mujeres, es la creciente tasa de cáncer de mama. Desde 1940, en los albores de la era química, las muertes por cáncer de mama han aumentado en EE UU en un 1 % anual, y se ha informado de incrementos semejantes en otros países industrializados.

Como ya se explicó en el anteriormente, para que los PAHs puedan desarrollar sus propiedades tóxicas, deben ser previamente activados metabólicamente. Los productos resultantes, tales como el 3-OH-B[a]P, dihidro diol B[a]P, dihydrodiol epóxido-B[a]P, etc., son los que tienen la capacidad de fijarse covalentemente a nivel del ADN o actuar como símiles de hormonas. Por ello, en términos de seguridad alimentaria, no sólo es importante determinar residuos de PAHs en los alimentos de origen animal, sino que también se debería controlar la presencia de posibles metabolitos.

## 4. CONTAMINACIÓN MEDIOAMBIENTAL POR PAHs

Los PAHs son un importante grupo de contaminantes orgánicos muy extendidos en el medio ambiente, donde pueden alcanzar importantes concentraciones. La mayoría de los PAHs presentes en el medio ambiente provienen de fuentes antropogénicas [**Lichtfouse y col., 1997; Harvey, 1998; Howsam y Jones, 1998**], mientras que son pocos los originados a partir de fuentes naturales [**Capaccioni y col., 1995; Simoneit, 1998; Wilcke, 2000**]. Estos compuestos se han hallado en el aire de las grandes ciudades en elevadas concentraciones debido a la intensidad del tráfico o la existencia de fuentes directas de combustión, pero también se encuentran en las aguas, los sedimentos y los lagos de alta montaña [**Carrera y col., 2001; Fernández y col., 1999; Vilanova y col., 2001**]. Gracias a su relativa volatilidad o a su capacidad de adsorción a las partículas atmosféricas, los PAHs se transportan continuamente a través del aire, pudiendo ser depositados en lugares remotos a gran distancia de la fuente emisora, ampliando así la dimensión de un problema local o regional a una escala planetaria.

La contaminación mundial por PAHs se ha debido principalmente a la producción industrial a gran escala en el hemisferio norte desde la Revolución Industrial [**Sanders y col., 1995**]. Las concentraciones han aumentado desde este momento hasta los años 1960-1980. A partir de aquí la disminución de las deposiciones se relaciona con la sustitución del carbón como fuente de energía de centrales hidroeléctricas por gas natural o por energía nuclear, la disminución de la industria pesada, y la regulación de la contaminación del aire [**Sanders y col., 1995; Berset y col., 2001**].

Como consecuencia de la gran variedad de procesos que producen los PAHs, éstos se encuentran en pequeñas concentraciones en todos los sedimentos y suelos del planeta. El estudio de los cambios de sus niveles en zonas remotas permite conocer si la influencia antropogénica ha dado lugar a incrementos significativos de su nivel de fondo y, por tanto, da una idea

---

**Lichtfouse, E.H.; Budzinski, H.; Garrigues, P.; Eglinton, T., 1997.** Organic Geochemistry, 26, 353-359.

**Harvey, R., 1998.** Environmental chemistry of PAHs. Ed. In Neilson, A.H.: PAHs and related compounds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-54.

**Howsam, M.; Jones, K.C., 1998.** Sources of PAHs in the environment. In Neilson, A.H. (ed.): PAHs and related compounds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 137-174.

**Capacioni, B.; Martini, M.; Mangani, F., 1995.** Bulletin of Volcanology, 56, 593-600.

**Simoneit, B.R.T., 1998.** Biomarker PAHs in the environment. In Neilson, A.H. (ed.): PAHs and related compounds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 175-215.

**Wilcke, W., 2000.** Journal of Plant Nutrition and Soil Science—Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 163 (3), 229-248.

**Carrera, G.; Fernández, P.; Vilanova, R.M.; Grimalt, J.O., 2001.** Atmospheric Environment, 35(2), 245-254.

**Fernández, P.; Vilanova, R.M.; Grimalt, J.O., 1999.** Environmental Science and Technology, 33(21), 3716-3722.

**Vilanova, R.M.; Fernández, P.; Martínez, C.; Grimalt, J.O.; 2001.** Water Research, 35 (16), 3916-3926.

**Sanders, G.; Jones, K. C.; Hamilton-Taylor, J.; Dorr, H., 1995.** Environmental Pollution, 89, 17-25.

**Berset, J. D.; Kuehne, P.; Shotyk, W., 2001.** Environmental Science and Technology, 267, 67-85.

bastante exacta de la exposición general a la que se encuentran todos los organismos vivos [**IPCS, 1998**].

La acumulación a través del tiempo de contaminantes ambientales en capas de sedimentos marinos o de lagos inalterados, hielos polares, turberas, o musgos, pueden ser utilizadas para estudiar la evolución histórica de los niveles de contaminantes en el medio ambiente. **Fernández y col., 2000**, dieron a conocer la historia de las variaciones de los PAHs en Europa. La investigación se ha basado en el estudio de estos compuestos en los sedimentos de lagos de alta montaña, es decir, aquellos situados por encima de la línea de vegetación arbolada que sólo reciben aportaciones hídricas atmosféricas. Estos lagos sólo reciben, por tanto, aportes de contaminantes transportados por vía atmosférica y los cambios temporales registrados en sus sedimentos reflejan en última instancia los flujos de deposición atmosférica a lo largo del tiempo. Un aspecto destacado en este estudio es que las mezclas de PAHs encontradas son bastante uniformes independientemente del lugar examinado. La composición de las mismas refleja un predominio de contribuciones provenientes de centrales térmicas, lo cual es coherente con la gran demanda de energía asociada a la Revolución Industrial. Por el contrario, los cambios de los procesos de combustión resultantes de las mejoras tecnológicas y las mayores exigencias ambientales probablemente explican el descenso observado a partir de los años 1960-1980, a pesar de que la demanda social de energía ha continuado en aumento.

En numerosas ocasiones se ha evaluado la tendencia histórica de la deposición atmosférica de contaminantes orgánicos usando muestras de turba [**Aamot y col., 1987; Bracewell y col., 1993; Himberg y Pakarinen, 1994; Rapaport y col., 1985; Rapaport y Eisenreich, 1986; Sanders y col., 1995**]. Según **Rapaport y Eisenreich, 1988**, la turba es el medio ideal para registrar los cambios en la deposición de contaminantes orgánicos hidrófobos por varias razones: (i) Las turberas reciben insumos químicos única y exclusivamente de la atmósfera y no se ven afectados por las aguas superficiales ni subterráneas. (ii) La turba está compuesta en un 97-99% de materia orgánica, los contaminantes orgánicos hidrófobos se adsorben fuertemente a esta matriz reduciendo al mínimo las posibilidades de movilidad o alteración diagenética tras la deposición [**Sanders y col., 1995**]. (iii) A

---

**IPCS, 1998.** Selected non-heterocyclic PAH. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva.

**Fernández, P.; Vilanova, R.M.; Martínez, C.; Appleby, P.; Grimalt, J.O., 2000.** Environmental Science and Technology, 34 (10), 1906-1913.

**Aamot, E.; Steinnes, E.; Schmid, R., 1996.** Environmental Pollution, 92(3), 275-280.

**Bracewell, J.M.; Hepburn, A.; Thomson, C., 1993.** Chemosphere, 27:1657-1667.

**Himberg, K.K.; Pakarinen, P., 1994.** Chemosphere, 29, 431-440.

**Rapaport, R.A.; Urban, N.R.; Capel, P.D.; Looney, B.B.; Eisenreich, S.J.; Gorham, E., 1985.** Chemosphere; 14, 1167-1173.

**Rapaport, R.A.; Eisenreich, S.J., 1986.** Atmospheric Environment, 20, 2367-2379.

**Sanders, G.; Jones, K. C.; Hamilton-Taylor, J.; Dorr, H., 1995.** Environmental Pollution, 89, 17-25.

diferencia de los suelos y sedimentos, las turbas no están sometidos a continuos cambios por los microorganismos del suelo [**Godwin, 1981**]. (iv) Sus aguas intersticiales son ligeramente ácidas (pH 4), anóxicas y ricas en materiales húmicos disueltos [**Shotyk, 1988**], la actividad microbiana es baja, disminuyendo las posibilidades de transformación de los compuestos químicos orgánicos antropogénicos [**Rapaport y Eisenreich, 1986**]. (v) Muchas turberas han ido acumulando turba desde el final de la última Edad de Hielo, ofreciendo así la oportunidad de construir registros continuos (hasta 15 000 años o más) de los cambios ambientales a largo plazo. De este modo, las turberas han permanecido inalteradas en los últimos cientos o miles de años, siendo los mayores sumideros terrestres de carbono y contaminantes ambientales (metales pesados, compuestos aromáticos condensados). Las turberas, además de servir como archivos de la deposición atmosférica de metales pesados y contaminantes orgánicos, proporcionan los registros de los cambios en los flujos de compuestos orgánicos originados por fuentes naturales y antropogénicas.

## **5. CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR PAHs Y SUS METABOLITOS**

La contaminación de los alimentos puede producirse tanto en origen, como durante su manipulación y/o procesado: utilización de sustancias derivadas del petróleo en la tecnología alimentaria, ahumado (tradicional o mediante aromas de humo) y en particular durante los tratamientos térmicos severos a los que se someten los alimentos tales como, secado, tostado, deshidratación, etc. [**Harvey, 1997**].

### **5.1. CONTAMINACIÓN EN ORIGEN**

La contaminación de los alimentos a partir de PAHs medioambientales, depende de sus propiedades físicas y químicas, tales como su solubilidad en agua, capacidad para ligarse a la materia orgánica, volatilidad, reactividad química o capacidad para ser degradados. Todas aquellas fuentes que generan humos, liberan grandes cargas de PAHs al medio aéreo. La mayor parte de los PAHs atmosféricos con más de 5 anillos aromáticos, son transportados ligados a materia particulada. En cambio los PAHs con dos o tres anillos, al ser más volátiles, se encuentran mayoritariamente en fase vapor. Los PAHs con cuatro anillos, se sitúan en una posición intermedia. Cuando estos compuestos se depositan en la superficie terrestre, contaminan los suelos,

---

**Godwin, H., 1981.** The archives of the peat bog, Cambridge University Press, Cambridge.

**Shotyk, W., 1988.** Earth-Science Reviews, 25, 95–176.

**Rapaport, R.A.; Eisenreich, S.J., 1986.** Atmospheric Environment, 20, 2367–2379.

**Harvey, R.G., 1997.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Ed. Wiley-VCH, Inc., Chicago, 1-350.



recursos hídricos, cultivos, etc., incorporándose finalmente a la cadena alimentaria.

A continuación se abordarán las fuentes de contaminación en origen más importantes de los alimentos de origen vegetal y animal.

### **5.1.1. Fuentes de contaminación de alimentos de origen vegetal**

La acumulación de contaminantes en las plantas es un paso importante para la transferencia de éstos a la cadena alimentaria terrestre [**Jones y col., 1991; McLachlan, 1996; Mackay, 2000**]. Las plantas y hortalizas contaminadas pueden ser consumidas por los seres humanos o por el ganado que posteriormente sirve como alimento para el hombre. El proceso de acumulación de contaminantes de las plantas es esencial para evaluar la contaminación de los cultivos y la posterior exposición de los seres humanos.

Una vez que los PAHs son liberados a la atmósfera pueden ser transportados a grandes distancias de su fuente de emisión y depositados en el medio terrestre y acuático mediante deposición seca y húmeda. La deposición atmosférica se considera la principal fuente de contaminación de los vegetales por PAHs. Evidencia de ello es que las plantas de hoja ancha y gran superficie, contienen mayores cantidades de PAHs que los vegetales de hoja estrecha [**Böhme y col., 1999; Kipopoulou y col., 1999; Wennrich y col., 2001; Barber y col., 2004**]. Este fenómeno resulta mucho más importante en las grandes zonas industriales y a lo largo de vías con tráfico abundante [**Larsson y Salhberg, 1982; Nielsen y col., 1996**]. **Dennis y col., 1991**, también verificaron que los alimentos elaborados a base de harina integral (pan y cereales de desayuno) contenían mayores concentraciones de PAHs que los preparados con harina refinada, probablemente debido a la deposición de estos residuos sobre los tegumentos externos del grano.

Otra posible vía de contaminación de los vegetales por PAHs es a través del sistema radicular por transferencia de PAHs desde suelos, abonos o

---

**Jones, K. C.; Keating, T.; Diage, P.; Chang, A. C., 1991.** Journal of Environmental Quality, 20, 317-329.

**McLachlan, M. S., 1996.** Environmental Science and Technology, 30, 252-259.

**Mackay, D.; Fraser, A., 2000.** Environmental Pollution, 110(3), 375-391.

**Böhme, F.; Welsch-Pausch, R.; McLachlan, M.S., 1999.** Environmental Science and Technology, 33, 1805-1813.

**Kipopoulou, A.M.; Manoli, E.; Samara, C., 1999.** Environmental Pollution, 106, 369-380.

**Wennrich, L.; Popp, P.; Zeibig, M., 2001.** Journal of Environmental Analytical Chemistry, 82 (10), 677-690.

**Barber, J. L.; Thomas, G. O.; Kerstiens, G.; Jones, K. C., 2004.** Environmental Pollution, 128, 99-138.

**Larsson, B.K.; Salhberg, G., 1982.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in lettuce. Influence of a highway and an aluminium smelter. In: PAH: Physical and biological chemistry. Eds. Cooke, M.; Denis, A.J.; G.L., Battelle press, Columbus, Ohio.

**Nielsen, T.; Jorgensen, H.E.; Larsen, J.C.; Poulsen, M., 1996.** Science of the Total Environment, 189-190, 41-49.

**Dennis, M.J.; Massey, R.C.; Cripps, G.; Venn, I.; Howarth, N.; Lee, G., 1991.** Food Additives and Contaminants, 8, 4, 517-530.

enmendantes contaminados [**Duarte-Davison y Jones, 1996; Fismes y col., 2002; Collins y col., 2006; Gao y Lin, 2006**]. Hay autores que aseguran que no existe relación entre las concentraciones de PAHs en los suelos contaminados y las plantas cultivadas en los mismos. Éstos se basan en la escasa disponibilidad de los PAHs en el suelo, debido a su fuerte adsorción a la materia orgánica y a su baja solubilidad [**Wild y col., 1992; Simonich y col., 1995; Schnoor, 2002**].

Aún así, no hay que olvidar que los PAHs presentes tanto en suelos como en abonos orgánicos, pueden ser objeto de procesos metabólicos como consecuencia de la actividad biológica natural de los microorganismos presentes en los mismos. Hay autores que aseguran que algunos de los productos resultantes de su metabolización, presentan mayor toxicidad que los PAHs nativos, como los dihidroles o epóxidos que son potentes carcinógenos. [**Thakker y col., 1985; Sutherland, 1992; Kotterman y col., 1998**]. Además, estos metabolitos al ser más polares, son más biodisponibles para las plantas.

Por ello, hay que prestar atención a los niveles de PAHs en compost o estiércoles empleados como enmendantes en suelos de cultivo, ya que podrían albergar una importante carga microbiana con capacidad de metabolizar los PAHs que contiene.

### 5.1.2. Fuentes de contaminación de alimentos de origen animal

En este trabajo se analizaron los niveles de PAHs y sus metabolitos en dos tipos de alimentos de origen animal, la leche infantil y los moluscos bivalvos. Los niveles máximos de B[a]P están limitados por la legislación para ambos alimentos. No así, el contenido de sus metabolitos.

#### 5.1.2.1. Contaminación de la leche

La principal vía de incorporación de los PAHs a los rumiantes la constituyen los alimentos contaminados. Se ha evaluado que las vacas llegan a

---

**Duarte-Davidson, R.; Jones, K.C., 1996.** Science of the Total Environment, 185, 59-70.

**Fismes, J.; Perrin-Ganier, C.; Empereur-Bissonnet, P.; Morel, J. L., 2002.** Journal of Environmental Quality, 31, 1649-1656.

**Collins, C; Fryer, M.; Grosso, A., 2006.** Environmental Science and Technology, 40, 45-52.

**Gao, Y.; Ling, W., 2006.** Biology and Fertility of Soils, 42, 387-394.

**Wild, S.R.; Jones, K.C., 1992.** Science of the Total Environment, 119, 85-119.

**Simonich, S.L., Hites, R.A., 1995.** Environmental Science and Technology, 29, 2095-2103.

**Schnoor, J.L., 2002.** Phytoremediation of soil and groundwater. Groundwater Remediation Technologies Analysis Center—Technical Evaluation Report. TE-02.01.

**Thakker, D. R.; Yagi H.; Levin, W.; Wood, A. W; Conney, A. H.; Jerina. D. M., 1985.** PAHs: metabolic activation to ultimate carcinogens, p. 177-242. In M. W. Anders (ed.), Bioactivation of foreign compounds. Academic Press, Orlando, Fla.

**Sutherland, J. B. 1992.** Journal of Industrial Microbiology, 9, 53-62.

**Kotterman M.J.J; Vis, E.H.; Field, J.A., 1998.** Applied Environmental Microbiology, 64, 2853-2858.

ingerir de 65 a 1000 veces más PAHs que los humanos, lo que indicaría el riesgo potencial de contaminación de los alimentos que éstas producen **[Bulder y col., 2006]**. Aunque no es legalmente obligatorio, la mayor parte de los países cuentan con programas para controlar la presencia de PAHs en piensos y en materias primas empleadas para la elaboración de los mismos. Datos referentes a los programas de control llevados a cabo entre los años 2000 - 2004 por el Instituto de Seguridad Alimentaria Holandés, demuestran que la concentración de PAHs cancerígenos en ingredientes destinados a la producción de piensos, son elevados oscilando los del B[a]P entre los 2,0 y los 10 µg/Kg **[Bulder y col. 2006]**. También hay ensayos en los que se demuestra que la presencia de estos residuos en pastos (hierba y suelo) próximos a zonas muy industrializadas son hasta ocho veces superiores a los encontrados en pastos procedentes del medio rural **[Crépineau y col., 2003]**. Al pastar, las vacas y en general todos los rumiantes, no sólo ingieren hierba, sino que también incorporan entre un 0,50 - 18 % de suelo. Los suelos, debido a su elevado contenido en materia orgánica, tienen gran capacidad para fijar estos compuestos y mantenerlos ligados durante mucho tiempo. Por ello, constituye una importante fuente de contaminación para los animales herbívoros. En un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, se comprobó que los niveles de PAHs totales de un suelo periurbano, llegaban a alcanzar los 170 µg/Kg, frente a los 26 µg/Kg encontrados en un suelo del medio rural **[García-Falcón y col., 2006]**. Como ya se comentó anteriormente, la transferencia de PAHs nativos a la leche, procedentes de la alimentación de las vacas, es muy baja. La razón se debe a que estos residuos son metabolizados inmediatamente después de ser ingeridos por los rumiantes. De ahí que el habitual análisis de PAHs basado en la detección de moléculas nativas no es representativo de la contaminación real de alimentos de origen animal, y por tanto, los ensayos deberían incluir igualmente la determinación de sus metabolitos.

#### 5.1.2.2. Contaminación de moluscos bivalvos

La presencia de PAHs en el medio marino se debe principalmente a (i) los vertidos incontrolados de derivados del petróleo, procedentes del transporte marítimo, de los accidentes de buques petroleros o de residuos urbanos; (ii) a toda combustión incompleta a elevadas temperaturas o procesos pirolíticos en los que estén implicados combustibles fósiles y (iii) a la deposición atmosférica **[Perugini y col., 2007]**.

---

**Bulder, A.S.; Hoogenboom, L. A. P.; Kan, C. A.; Raamsdonk, L. W. D.; Bouwmeester, H., 2006.** Initial risk assessment of PAHs in feed (materials). Institute of Food Safety, Netherlands. [http://library.wur.nl/file/wurpubs/LUWPUBRD\\_00352428\\_A502\\_001.pdf](http://library.wur.nl/file/wurpubs/LUWPUBRD_00352428_A502_001.pdf).

**Crépineau, C.; Rycken, G.; Feidt, C.; Le Roux, Y.; Lichtfouse, E.; Laurent, F., 2003.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4841-4845.

**García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2006.** Environmental Science and Technology, 40, 759-763.

**Perugini, M.; Visciano, P.; Manera, M.; Turno, G.; Lucisano, A.; Amorena, M., 2007.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (5), 2049-2054.

La principal vía de contaminación por PAHs de los organismos marinos se produce a través de la cadena alimentaria, a partir de sedimentos contaminados o transportados por el agua [Jonsson y col., 2004]. Los PAHs, debido a su baja solubilidad, muestran una gran afinidad por la fracción orgánica y tienden a adsorberse a los materiales en suspensión en el agua, los cuales pueden llegar a depositarse en los sedimentos.

Al tratarse de compuestos lipofílicos, atraviesan con facilidad las membranas lipídicas acumulándose en los organismos acuáticos [Billiard y col., 2002]. Su metabolización en estos organismos dependerá de la especie animal. Generalmente, la capacidad metabólica en especies acuáticas comestibles es mayor en peces, intermedia en crustáceos y mínima en moluscos. Livingstone, 1994, ha observado que las especies filtradoras, como los bivalvos, acumulan en su interior grandes cantidades de PAHs, y los eliminan en menor medida que los vertebrados. Esta incapacidad metabólica los protege de sus metabolitos carcinogénicos, ya que los PAHs precisan de activación metabólica para poder ejercer sus acciones tóxicas. La habilidad de los bivalvos para filtrar el agua y acumular los PAHs del medio marino hace que sean buenos bioindicadores de contaminación medioambiental. De hecho, los mejillones se utilizan desde hace tiempo como organismos centinela, gracias, además, a su forma de vida sésil (viven adheridos a sustratos sin posibilidad de desplazamiento) [Marvin y col., 2000; Martín-Díaz y col., 2007; Labarta y col. 2005].

Desde el punto de vista toxicológico, estas cualidades convierten a los moluscos en alimentos de riesgo para el consumidor, de ahí que los poderes públicos hayan establecido un límite máximo para la presencia de B[a]P en este tipo de productos (10 µg/Kg) [Reglamento comunitario 1881/2006].

Perugini y col., 2007, analizaron 98 muestras de mejillón de una zona del Golfo de Nápoles próxima a un área industrial, con el fin de evaluar el riesgo al que están expuestos los consumidores. Las concentraciones

---

Jonsson, G.; Bechmann, R.K.; Bamber, S.D.; Baussant, T., 2004. Environmental Toxicology Chemistry, 23, 1538-1548.

Billiard, S.M.; Hahn, M.E.; Franks, D.G.; Peterson, R.E.; Bols, N.C.; Hodson, P.V., 2002. Comparative Biochemistry Physiology-Part B, 133, 55-68.

Livingstone, D.R., 2004. Toxicol Ecotoxicol News 1, 88-95.

Marvin, C.; Allan, L.; Bryant, D.; McCarry, B., 2000. Water Quality Research Journal of Canada. 35 (1), 59-72.

Martín-Díaz, M.L.; Blasco, J.; Sales, D.; DelValls, T.A., 2007. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 53 (1), 66-76.

Labarta, U.; Fernández-Reiriz, M.J.; Garrido, J. L.; Babarro, J. M. F.; Bayona, J. M.; Albaigés, J., 2005. Marine Ecology Progress Series, 302, 135-145.

Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Reglamento (CE) 208/2005 de la Comisión, de 4 de febrero de 2005, por el que se modifica el Reglamento 466/2001 en lo relativo a los PAHs.

Perugini, M.; Visciano, P.; Manera, M.; Turno, G.; Lucisano, A.; Amorena, M., 2007. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (5), 2049-2054.

encontradas oscilaron entre 78 y 175 µg/kg para el total de PAHs. Los niveles de B[a]P sobrepasaron el límite en el 37% de las muestras **[Reglamento comunitario 208/2005]**.

En Galicia, donde la pesca de moluscos bivalvos es una actividad de gran importancia socioeconómica, se han desarrollado en los últimos años numerosos estudios para determinar el contenido de PAHs y evaluar sus efectos en estas especies marinas **[Porte y col., 2000; Nieto y col., 2006; Ordás y col., 2007]**. Esto se debe a que sus costas soportan un intenso tráfico marítimo y a que han sufrido numerosos accidentes petroleros desde los años 50 como el “Andros Fortune” (1961), “Polycommander” (1970), “Urquiola” (1976), “Andros Patria” (1979), “Mar Egeo” (1992) y el “Prestige” (2002). Como consecuencia de todo ello se han producido vertidos de petróleo y derivados que han contaminado el ecosistema marino con PAHs. Tras el vertido provocado por el Mar Egeo, **Porte y col., 2000**, realizaron un estudio sobre la acumulación temporal de PAH en bivalvos: mejillones (*Mytilus edulis*), almejas (*Tapes semidecussata*), berberechos (*Cardium edule*) y ostras (*Ostrea edulis*). A los tres meses del accidente, en las zonas más afectadas los niveles de PAHs, eran de 2,4; 1,5; 1,8 y 0,59 mg/kg para mejillones, almejas, berberechos y ostras, respectivamente. Transcurrido un año, las concentraciones de PAHs habían descendido entre un 17%, en mejillones, y un 48%, en ostras. Entre las rías de Arosa y Muros, tres días después del hundimiento del Prestige los niveles de PAHs en mejillones eran alarmantes, entre 2,5 y 5,9 mg/kg de peso seco **[Nieto y col., 2006]**.

## 5.2. CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS DURANTE SU MANIPULACIÓN O PROCESADO

La contaminación de los alimentos por PAHs también se produce durante su manipulación y/o procesado. Las tres grandes fuentes responsables de su presencia en alimentos manufacturados son: la utilización de sustancias derivadas del petróleo en la tecnología alimentaria; el ahumado, ya sea tradicional o mediante el empleo de aromas de humo; y los tratamientos térmicos severos, como puede ser el tostado y el secado **[Chen, 1996]**.

En la tecnología alimentaria las sustancias derivadas del petróleo (parafinas y aceites minerales) pueden estar contaminadas con PAHs **[Haenni,**

---

**Reglamento (CE) 208/2005** de la Comisión, de 4 de febrero de 2005, por el que se modifica el Reglamento 466/2001 en lo relativo a los PAHs.

**Porte, C.; Biosca, X.; Pastor, D.; Solé, M.; Albaigés, J., 2000.** Environmental Science and Technology, 34, 5067-5075.

**Nieto, O.; Aboigor, J.; Buján, R.; N'Diaye, M.; Graña, J.; Saco-Álvarez, L.; Franco, A.; Soriano, J.A.; Beiras, R., 2006.** Marine Ecology Progress Series, 328, 41-49.

**Ordás, M.C.; Albaigés, J.; Bayona, J.M.; Ordás, A.; Figueras, A., 2007.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52, 200-206.

**Chen, B.H.; Lin, Y.S., 1997.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1394-1403.

**1968]**. Éstas se utilizan con diversos fines, como la lubricación de piezas mecánicas, el revestimiento interno de sistemas de empaquetamiento o el desmolde de pasta de pan.

El ahumado, especialmente el tradicional, constituye una fuente importante de contaminación [**Harvey, 1997**]. Los niveles de PAHs aportados al alimento por este tratamiento tecnológico, dependen de diferentes factores como: tipo y composición de la madera, técnica de ahumado (directo o indirecto), tipo de generador, accesibilidad del oxígeno, temperatura y tiempo de exposición del alimento, etc. [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**]. Hay diversos estudios [**Roda y col., 1999; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**], en los que se compara la presencia de estos residuos en alimentos que han sido ahumados en hornos modernos y en hornos tradicionales. En los primeros, el generador de humo está separado de la cámara de ahumado, en donde se sitúan los alimentos, lo que permite dotarlos con procedimientos que eliminen las partículas en suspensión. En los hornos tradicionales, el humo entra en contacto directo con los alimentos y se suelen alcanzar temperaturas de combustión muy elevadas. Se encontraron mayores concentraciones de B[a]P en pescado ahumado en hornos tradicionales, 1,2 µg/kg, que en hornos modernos, 0,10 µg/kg.

Finalmente, la exposición de los alimentos a elevadas temperaturas, también constituye otra fuente de contaminación de interés. Los PAHs se pueden formar durante la preparación doméstica o en la elaboración industrial de los alimentos, en procesos como: secado o cocinado (tostado, fritura, asado a la barbacoa o a la parrilla, etc.), atomización o hidrogenación de grasas.

En este trabajo se evaluará la formación de PAHs en dos alimentos ricos en hidratos de carbono (pan tostado y cereales infantiles), los cuales son sometidos a alguna etapa de su procesado a tratamientos térmicos severos. La legislación europea establece un límite máximo de 1,0 µg/kg para la presencia de B[a]P en los cereales infantiles, al estar destinados a un colectivo de alto riesgo.

### **5.2.1. Los tratamientos térmicos severos y la síntesis de PAHs**

Los tratamientos térmicos severos pueden aplicarse a los alimentos de forma indirecta o directa.

---

**Haenni, E.O., 1968.** Residue Reviews, 24, 42-78.

**Harvey, R.G., 1997.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Ed. Wiley-VCH, Inc., Chicago, 1-350.

**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002.** Opinion of the science committee on food on the risk to human health of PAHs-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

**Roda, A.; Simoni, P.; Ferri, E.N.; Girotti, S.; Ius, A.; Rauch, P.; Pospisil, M.; Pipek, P.; Hochel, I.; Fukal, L., 1999.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 58-62.

- **Indirecta.** El agente térmico no entra en contacto directo con el alimento. Un ejemplo de esta modalidad es el horneado eléctrico, donde el calor es transmitido a través de una pared metálica hacia el producto. La contaminación por PAHs causada por la aplicación de un tratamiento térmico indirecto se deberá a la pirólisis de los principios inmediatos del alimento. Diferentes trabajos experimentales han verificado la formación de PAHs al someter a pirólisis los glúcidos, lípidos y prótidos. En un estudio recogido por **Fazio y Howard, 1983**, en el que se analizaron cenizas obtenidas de calentar almidón a distintas temperaturas, se comprobó que a temperaturas inferiores a 370-390 °C los niveles de B[a]P no sobrepasaban los 0,70 µg/Kg. Este valor se incrementaba hasta 17 µg/Kg si la temperatura alcanzaba los 650 °C. **Fazio y Howard, 1983**, tampoco encontraron B[a]P a niveles detectables, en las cenizas resultantes de calentar carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos a 300 °C. En cambio 19 PAHs, incluido el B[a]P, fueron cuantificados en los mismos productos obtenidos a 500-700 °C. También existen evidencias de que es la pirólisis de los lípidos, especialmente la del colesterol, la que genera mayores niveles de estos residuos. Así, **Fazio y Howard, 1983**, encontraron que la combustión de los lípidos a 700 °C llegaba a producir hasta 100 µg/Kg de B[a]P [**Fazio y Howard, 1983; Derache, 1990; Menzie y col., 1992**].

- **Directa.** En este caso sí hay un contacto directo entre la fuente calefactora y el producto. El asado en barbacoa o en horno de gas son algunas técnicas culinarias en las que se aplica un tratamiento térmico directo. La contaminación por PAHs en los alimentos procesados mediante este tipo de tratamientos es doble: debida a la pirólisis de los principios inmediatos y a la deposición de PAHs arrastrados por los humos de la combustión. Esta segunda fuente de contaminación dependerá de las condiciones de combustión (tipo de combustible empleado (carbón, madera, gas, etc), temperatura, aireación, intensidad de la llama, cantidad de materia particulada generada, etc) [**Rey-Salgueiro y col., 2004; García-Falcón y Simal-Gándara, 2005; Muthumbi y col., 2003**].

El pan tostado y los cereales infantiles son alimentos susceptibles de contaminarse por PAHs durante su procesado industrial, ya que incluye una o varias etapas en la que se somete el producto a un tratamiento térmico severo. En cuanto al pan, el proceso de cocción y tostado a nivel industrial, suele llevarse a cabo mediante el empleo de hornos eléctricos o de gas, que pueden llegar a alcanzar entre 300 y 350 °C. Los cereales infantiles se someten a una

---

**Fazio, T.; Howard, J.W., 1983.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. In Bjorseth (ed.), Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, New York: 461-505.

**Derache, R., 1990.** Toxicología y seguridad de los alimentos. Ed. Omega S.A., Barcelona, 296-318.

**Menzie, Ch. A.; Potocki, B.B.; Santodonato, J., 1992.** Environmental Science and Technology, 26 (7), 1278-1284.

**Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2004.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3900-3904.

**García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J., 2005.** Food Additives and Contaminants, 22(1), 1-8.

**Muthumbi, W.; De Boever, P.; Pieters, J.G.; Siciliano, S.; D'hooge, W.; Verstraete, W., 2003.** Journal Environmental Quality, 32, 417-422.

etapa de tostado a 120-150°C y otra de secado en secadores de rodillos, a 115-150°C. Aunque estos equipos están provistos de dispositivos de control de temperatura, pueden producirse pérdidas puntuales de la misma provocándose calcinaciones parciales en el producto, lo que conllevaría a la contaminación del mismo por PAHs.

Son pocos los artículos en los que se estudia la contaminación con PAHs durante el tostado de pan [**Lintas y col., 1979; Kayali-Sayadi y col., 2000**]. **Lintas y col., 1979**, comprobaron que el tiempo de tostado condiciona los niveles de B[a]P en esta matriz. El contenido de este analito se incrementa de 0,39 a 0,56 µg/Kg, si el tiempo de tostado pasa de 3 a 5 minutos. Lo que no indican estos autores, es la técnica que emplearon para el tostado. **Kayali-Sayadi y col., 2000**, encontraron Na, Ac (acenafteno), Phe y DB[a,h]A en todas las muestras de pan analizadas. Los niveles oscilaron entre 0,32 y 9,4 para el Db[a,h]A y el Na, respectivamente. En ningún pan se encontró B[a]P a niveles cuantificables. **Nieva-Cano y col., 2001**, estudiaron la presencia de 16 PAHs en muestras de pan tostado comercial. Tan sólo 5 de estos PAHs (FL (fluoreno), Phe, An, F y Chr) fueron encontrados a niveles cuantificables, oscilando sus concentraciones entre 7,4 y 18 µg/Kg para el An y F, respectivamente. **Ahmed y col., 2000**, comprobaron cómo afecta el tipo de fuel empleado para la cocción de pan, sobre la síntesis de PAHs. La energía solar y el gas natural son las principales fuentes de energía empleadas en las panaderías egipcias. Aunque en algunas de ellas también se emplea la electricidad, los derivados del petróleo e incluso residuos sólidos urbanos o agrarios. Los mayores niveles de PAHs se encontraron en el pan horneado con derivados del petróleo y desperdicios urbanos (B[a]P: 21 y 45 µg/Kg, respectivamente), mientras que las muestras obtenidas en horno eléctrico registraron las menores concentraciones.

Igualmente, son pocos los artículos en los que se determinan PAHs en cereales infantiles. En el año 2006, la Agencia de Seguridad Alimentaria Británica [**Food Standards Agency, 2006**] determinó 15 PAHs en 111 alimentos infantiles, de los cuales 16 estaban elaborados a base de cereales, en ninguna de ellas se sobrepasó la concentración máxima de B[a]P establecida por la UE (1,0 µg/Kg).

Hay otros trabajos en los que estudia el contenido de PAHs en alimentos sometidos a tratamientos térmicos severos (tratamientos culinarios, tostado, secado, etc.), ya sean directos o indirectos. **Chen y Lin, 1997**, determinaron los efectos de diferentes técnicas culinarias (cocinado al vapor, asado al horno

---

**Lintas, C.; De Mattheaïs, M.C.; Merli, F., 1979.** Food and Cosmetics Toxicology, 17, 325-328.

**Kayali-Sayadi, M.N.; Rubio-Barroso, S.; García-Iranzo, R.; Polo-Díez, L.M., 2000.** Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 23(12), 1913-1925.

**Nieva-Cano, M.J.; Rubio-Barroso, S.; Santos-Delgado, M.J., 2001.** Analyst, 126, 1326-1331.

**Ahmed, M.T.; Hadi, E.A.; El Samahy, S.; Yousof, K., 2000.** Journal of Hazardous Materials, 80(1), 1-8.

**Food Standards Agency, 2006.** PAHs in baby foods and infant formulae. Food Surveillance Information Sheet, 09/06. [www.food.gov.uk/news/newsarchive/2006/may/pahsurvey](http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2006/may/pahsurvey).

**Chen, B.H.; Lin, Y.S., 1997.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1394-1403.



y asado a la barbacoa con carbón) sobre la formación de PAHs en filetes de pechuga de pato. La técnica que produce mayores niveles de residuos es la barbacoa, seguida del ahumado natural, asado y del cocinado al vapor. **Kazerouni y col., 2001**, encontraron resultados semejantes a estos, al analizar carnes cocinadas mediante distintas técnicas (barbacoa, asado y fritura en sartén). Con diferencia es la barbacoa la que da lugar a alimentos más contaminados, llegando a alcanzar la concentración del B[a]P 4,9 µg/Kg. **Mottier y col., 2000**, analizaron diferentes tipos de salchichas cocinadas con carbón a la barbacoa. En general los niveles de PAHs cancerígenos fueron bajos, tan sólo en las salchichas de cordero (con alto contenido lipídico) se alcanzaron concentraciones elevadas (suma de PAHs cancerígenos: 1,9 µg/Kg).

La síntesis de PAHs durante el tostado de alimentos como café [**Lintas y col., 1979**], té [**Lintas y col., 1979; Lin y Zhu, 2006**], cebada, etc también ha sido evaluada por diversos autores. En el caso del café, los niveles de PAHs suelen ser bajos. En general en muestras sometidas a un tostado medio, la concentración de B[a]P no sobrepasa 1,0 µg/Kg (**Tabla 2**). En el caso del té, los estudios revelan una mayor contaminación del producto. **Lin y Zhu, 2006**, analizaron diferentes tipos de hojas de té, obteniendo concentraciones de B[a]P muy elevadas, entre 6,8 y 246 µg/Kg. Aún así, estos mismos autores manifiestan, que la transferencia de los PAHs a la infusión es muy baja. De manera que el B[a]P en la bebida no llega a alcanzar ni 1,0 µg/Kg.

---

**Kazerouni, N.; Sinha, R.; Hsu, C.H.; Greenberg, A.; Rothmana, N., 2001.** Food and Chemical Toxicology, 39, 423-436.

**Mottier, P.; Parisod, V.; Turesky, R.J., 2000.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(4), 1160-1166.

**Lintas, C.; De Mattheaïs, M.C.; Merli, F., 1979.** Food and Cosmetics Toxicology, 17, 325-328.

**Lin, D; Zhu, L, 2006.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (12), 4350-4354.

**Tabla 2.** Niveles de B[a]P y otros PAHs en alimentos sometidos a diferentes tratamientos culinarios (µg/Kg).

Técnica de procesado	Alimento	ΣPAHs	B[a]P	Autores
<b>Tostado</b>	Infusión de café	14-23 ng/L	1,6-3,4 ng/L	<i>Kayali-Sayadi y col., 1999</i>
	Infusión de café	nd-162 ng/L	nd-100 ng/L	<i>Houessou y col., 2005</i>
	Café soluble	<0,14	<0,10	<i>García-Falcón y col., 2005</i>
	Grano de café	22-65	nd-0,33	<i>Houessou y col., 2006</i>
	Pan	18-67	nc	<i>Nieva-Cano y col., 2001</i>
<b>Barbacoa</b>		9,3-18	nd	<i>Kayali-Sayadi y col., 2000</i>
	Carne de pato	151-300	3,7-5,0	<i>Chen y Lin, 1997</i>
	Salchichas	6,4-79	nd-0,32	<i>Mottier y col., 2000</i>
<b>Asado en horno</b>	Pechuga de pato	89-128	nd3,0	<i>Chen y Lin, 1997</i>
<b>Ahumado</b>	Carne	24-64	0,080-0,090	<i>Duedahl-Olesen y col., 2006</i>
	Pescado	22-1390	0,080-3,9	
	Chorizo	53-71	3,0	<i>García-Falcón y Simal-Gándara, 2005</i>

*Kayali-Sayadi, M.N.; Rubio-Barroso, S.; Cuesta-Jiménez, M.P.; Polo-Díez, L.M., 1999. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 22(4), 615-627.*

*Houessou, J.K.; Benac, C.; Delteil, C.; Camel, V., 2005. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 871-879.*

*García-Falcón, M.S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J., 2005. Food Chemistry, 90, 643-647.*

*Houessou, J.K.; Delteil, C.; Camel, V., 2006. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 7413.*

*Nieva-Cano, M.J.; Rubio-Barroso, S.; Santos-Delgado, M.J., 2001. Analyst, 126, 1326-1331.*

*Kayali-Sayadi, M.N.; Rubio-Barroso, S.; García-Iranzo, R.; Polo-Díez, L.M., 2000. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 23(12), 1913-1925.*

*Mottier, P.; Parisod, V.; Turesky, R.J., 2000. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(4), 1160-1166.*

*Duedahl-Olesen, L.; White, S.; Binderup, M.L., 2006. Polycyclic Aromatic Compounds, 26(3), 163-184.*

*García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J., 2005. Food Additives and Contaminants, 22(1), 1-8.*

## 6. NIVELES DE PAHs Y SUS METABOLITOS EN ALIMENTOS: ASPECTOS LEGALES

En la actualidad no se cuenta con información científica suficiente, como para poder establecer, en los productos alimenticios un límite máximo de cada uno de los 15 PAHs seleccionados por el Comité Científico de la Alimentación Humana, como posibles residuos cancerígenos en alimentos [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**]. Por ello la UE eligió como representante de grupo, uno de los PAHs más cancerígenos y estudiado, el B[a]P. En el **Reglamento 1881/2006** se establecen los límites máximos de este residuo en diferentes alimentos susceptibles de presentar contaminación por PAHs (aceites y grasas destinados al consumo directo, productos ahumados, moluscos bivalvos, etc.).

Teniendo en cuenta que los niños constituyen un importante grupo de riesgo, se limita el contenido de B[a]P a 1,0 µg/Kg en los “productos alimenticios destinados a lactantes y niños de corta edad”, abarcando, entre otros, las fórmulas lácteas y los alimentos elaborados a base de cereales.

Los alimentos expuestos a un alto nivel de contaminación medioambiental, como el pescado y los productos de la pesca (moluscos bivalvos, crustáceos, cefalópodos), también están contemplados en este Reglamento. El límite establecido de B[a]P para los moluscos bivalvos es de 10 µg/Kg peso fresco.

El pan tostado no está contemplado en esta normativa, aún así, el Comité Científico de la Alimentación Humana (recomendación de la comisión de 4 de febrero de 2005) reclama de los estados miembros, llevar a cabo un análisis más detallado de las proporciones relativas de los 15 PAHs cancerígenos en los alimentos que por sus procesos tecnológicos sean susceptibles de contenerlos, con objeto de:

- Aportar información para establecer límites en aquellos alimentos no contemplados en la legislación.
- Justificar la conveniencia de mantener el B[a]P como marcador del grupo. En recientes estudios [**Kazerouni y col., 2001**] se confirmó que el B[a]P no resulta un correcto marcador para la presencia de PAHs cancerígenos

---

**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002.** Opinion of the science committee on food on the risk to human health of PAHs-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

**Kazerouni, N.; Sinha, R., Hsu, C.H.; Greenberg, A.; Rothmana, N., 2001.** Food and Chemical Toxicology, 39, 423-436.

de bajo peso molecular (2-3 anillos aromáticos). En cambio sí resulta un marcador adecuado para PAHs entre 4 y 5 anillos.

Por último, es de destacar que hasta la fecha, la legislación no contempla la presencia de los metabolitos de PAHs en los alimentos de origen animal. Teniendo en cuenta que a estos alimentos no sólo se transfieren los PAHs nativos, sino que también lo hacen sus metabolitos, sería de interés aportar información en este campo, para que la comisión europea lo tenga en consideración en subsiguientes publicaciones.

## **Parte Experimental**

---



## 1. COMPUESTOS Y MATERIALES

### 1.1. DISOLVENTES

En la **Tabla 1** se recogen los diferentes disolventes empleados en la elaboración de las disoluciones patrón de los compuestos objeto de estudio, en la puesta a punto de métodos analíticos y en el análisis de las muestras.

**Tabla 1.** Disolventes empleados en el desarrollo del presente trabajo.

Marca comercial	Disolvente (grado HPLC)
MERK	Diclorometano (DCM)
PANREAC	Acetona
	Acetonitrilo (AcN)
	Acetato de etilo (AcEt)
	Agua
	Metanol (MetOH)
SCHARLAU	Tolueno
	n-hexano (n-hex)

## 1.2. REACTIVOS

En la **Tabla 2** se muestran los diferentes reactivos empleados en esta Tesis Doctoral.

**Tabla 2.** Reactivos empleados, modo de preparación y/o uso al que han sido destinados.

Reactivos	Marca comercial	Preparación/Uso
Acetato amónico (97%) Ácido acético	PANREAC	Disolución Buffer en la que se incubarán los extractos de leche para la hidrólisis enzimática de las formas conjugadas de los metabolitos
Tert-butil hidroquinona (97 %)	ALDRICH	Disolución de 2,0 g/L en acetonitrilo, empleadas como antioxidante durante el procesado de las muestras
Ácido Ascórbico Ácido Gálico	SIGMA ALDRICH	Disoluciones 2,0 g/L en agua, empleadas como antioxidante durante el procesado de las muestras
Tritón-X 100 R	SUPELCO	Disolución de 5,0 g/L en H <sub>2</sub> O o AcN, empleada para prevenir la degradación de los metabolitos durante el procesado de la muestra.
β-D-Glucuronidasa y Ariisulfatasa en solución acuosa estabilizada con thiomerosal	ROCHE	Hidrólisis simultánea de β-glucurónidos y sulfato esteres en orina y otros fluidos biológicos



### 1.3. PATRONES


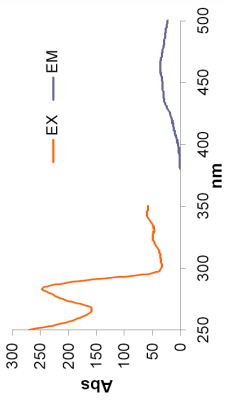
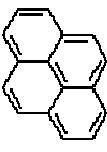
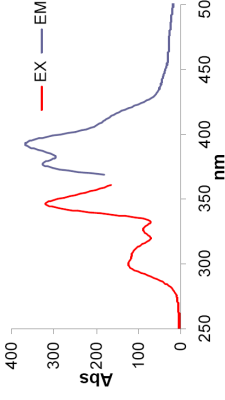
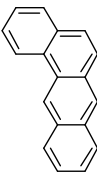
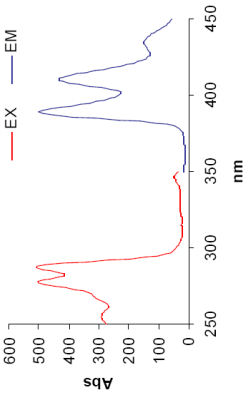
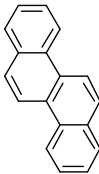
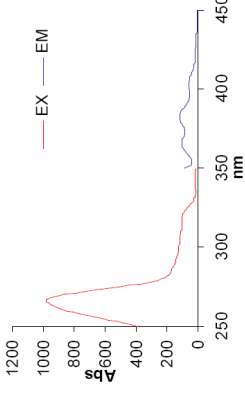
Los patrones puros de los compuestos determinados en el presente trabajo se reflejan en la siguiente Tabla (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Patrones puros de los compuestos objeto de estudio.

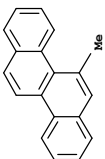
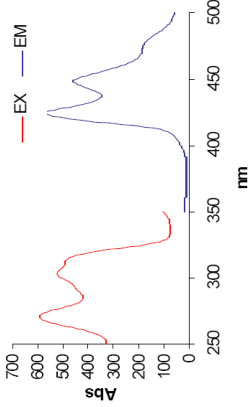
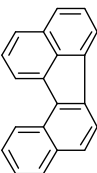
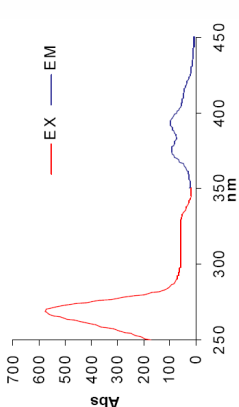
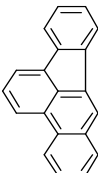
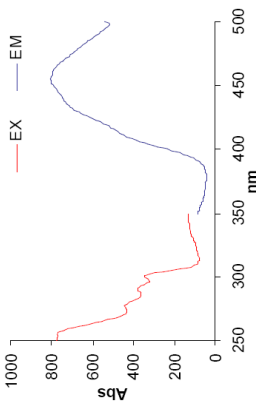
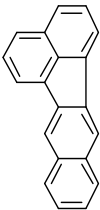
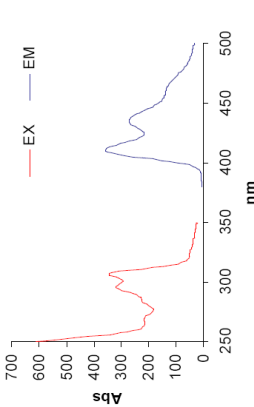
Marca comercial	Compuesto (%pureza)
ALDRICH	Fluoranteno (99%)
	Pireno (99%)
	Criseno (97%)
	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno (98%)
	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno (98%)
	Benzo[ <i>a</i> ]pireno (97%)
	Dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno (98%)
	Benzo[ <i>ghi</i> ]perileno (98%)
	Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno (98%)
	3-Hidroxi-Benzo[ <i>a</i> ]pireno (99%)
SUPELCO	1-Hidroxi-Pireno (98%)
	Benzo[ <i>a</i> ]antraceno (98%)
	5-Metilcriseno (99%)
ISOSTANDARS MATERIAL	Benzo[ <i>j</i> ]fluoranteno (100%)
	Dibenzo[ <i>a,l</i> ]pireno (99%)

En la **Tabla 4** se recogen la estructura y ficha técnica de los PAHs y metabolitos objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

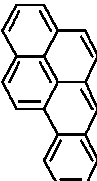
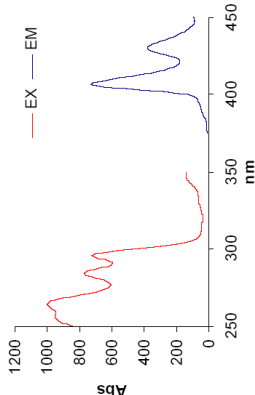
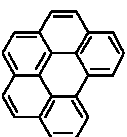
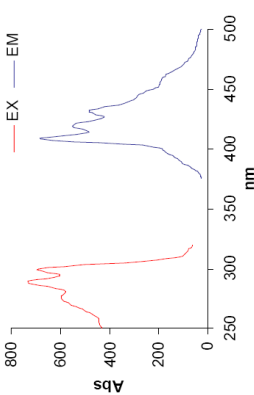
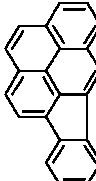
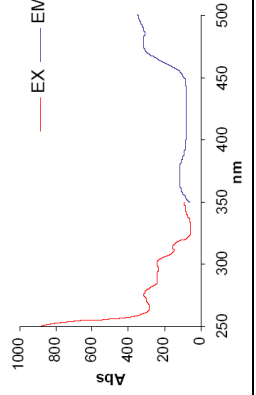
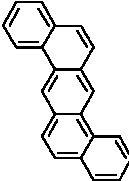
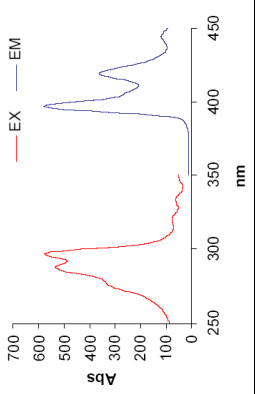
**Tabla 4.** Estructura y ficha técnica de los PAHs y metabolitos objeto de estudio. Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006.

Compuesto Estructura	N° CAS	Fórmula empírica	Sinónimos	Características	Espectros de fluorescencia
<b>Fluoranteno</b> 	206-44-0	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	1,2-(1,8-Naftileno)benzeno; Benzeno, 1,2-(1,8-naftalenodil); Benzo[k]fluoreno	PM: 202g Pto.fus.:110°C Sol.: 1,3x10 <sup>-6</sup> mol/L	
<b>Pireno</b> 	129-00-0	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	β-Pireno; Benzo[de]fenantreno	PM.: 252g Pto.fus.: 151°C Sol.: 2,2x10 <sup>-7</sup> mol/L	
<b>Benzo[a]antraceno</b> 	56-55-3	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	1,2-Benzo[a]antraceno 2,3-Benzofenantreno Benzoantraceno Benzo[b]fenantreno Tetrafenno	PM.: 228g Pto.fus.: 160°C Sol.: 6,4x10 <sup>-8</sup> mol/L	
<b>Chryseno</b> 	218-01-9	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	1,2,-Dibenzfenantreno 1,2-Benzofenantreno Benzo[a]fenantreno	PM.: 228g Pto.fus.: 253°C Sol.: 4,2x10 <sup>-8</sup> mol/L	

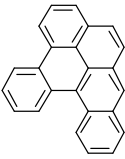
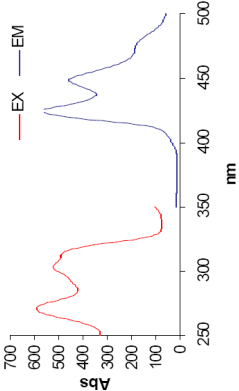
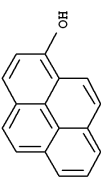
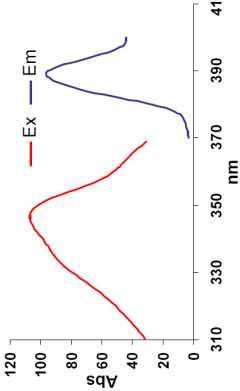
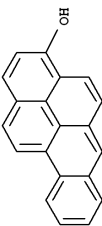
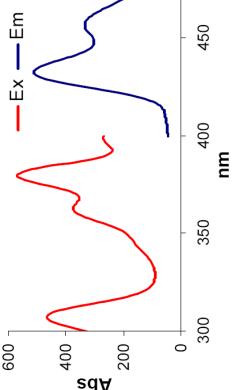
**Tabla 4 (continuación).** Estructura y ficha técnica de los PAHs y metabolitos objeto de estudio. Datos obtenidos de SciFinder Scholar 2006.

Compuesto Estructura	Nº CAS	Fórmula empírica	Sinónimos	Características	Espectros de fluorescencia
<b>5-Metilchryseno</b> 	3697-24-3	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub>		PM.: 242g Pto.fus.: 117°C Sol.: 4 x10 <sup>-8</sup> mol/L	
<b>Benzo[j]fluoranteno</b> 	205-82-3	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	10,11-Benzofluoranteno 7,8-Benzofluoranteno Benzo-12,13-fluoranteno Dibenzo[a,k]fluoreno	PM.: 252g Pto.fus.: 166°C Sol.: 2 x10 <sup>-8</sup> mol/L	
<b>Benzo[b]fluoranteno</b> 	205-99-2	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	2,3-Benzfluoranteno 3,4-Benzfluoranteno 3,4-Benz[e]acefenantileno Benzo[e]fluoranteno	PM.: 252g Pto.fus.: 164°C Sol.: 2,0x10 <sup>-8</sup> mol/L	
<b>Benzo[k]fluoranteno</b> 	207-08-9	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	11,12-Benzofluoranteno 8,9-Benzfluoranteno Dibenzo[b,k,j]fluoreno	PM.: 252g Pto.fus.: 217°C Sol.: 1,3x10 <sup>-8</sup> mol/L	

**Tabla 4 (continuación).** Estructura y ficha técnica de los PAHs y metabolitos objeto de estudio. Datos obtenidos de SciFinder Scholar 2006.

Compuesto Estructura	Nº CAS	Fórmula empírica	Sinónimos	Características	Espectros de fluorescencia
<b>Benzo[a]pireno</b> 	50-32-8	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	3,4-Benzopireno 3,4-Benzo[a]pireno 4,5-Benzpireno 6,7-Benzopireno Benzo[d,e,f]criseno	PM.: 252g Pto.fus.: 178°C Sol.: 7,4x10 <sup>-9</sup> mol/L	
<b>Benzo[ghi]perileno</b> 	191-24-2	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	1,12-Benzoperileno	PM.: 276g Pto.fus.: 278°C Sol.: 5,9x10 <sup>-9</sup> mol/L	
<b>Indeno[1,2,3-cd]pireno</b> 	193-39-5	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	11,10-(1,2-fenileno)pireno 1,10-(o-fenileno)pireno	PM.: 276g Pto.fus.: 163°C Sol.: 6,8x10 <sup>-9</sup> mol/L	
<b>Dibenzo[a,h]antraceno</b> 	53-70-3	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	1,2:5,6-Benzooantraceno 1,2:5,6-Dibenzoantraceno 1,2:5,6-Dibenzo[a]antraceno	PM.: 278g Pto.fus.: 266°C Sol.: 2,5x10 <sup>-9</sup> mol/L	

**Tabla 4 (continuación).** Estructura y ficha técnica de los PAHs y metabolitos objeto de estudio. Datos obtenidos de SciFinder Scholar 2006.

Compuesto Estructura	Nº CAS	Fórmula empírica	Sinónimos	Características	Espectros de fluorescencia
<b>Dibenzo[a,]pireno</b> 	191-30-0	C <sub>24</sub> H <sub>12</sub>	1,2:3,4-Dibenzopireno 1,2,9,10-Dibenzopireno 2,3:4,5-Dibenzopireno 4,5,6,7-Dibenzopireno Dibenzo[def,p]chrysene	PM.: 302g Pto.fus.: 307°C Sol.: 8,8 x10 <sup>-10</sup> mol/L	
<b>1-Hidroxi-Pireno</b> 	5315-79-7	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O	1-Hidroxi-pireno 3-Hidroxi-pireno 3-Pirenol	PM.: 218 g Pto.fus.: 180°C Sol.: 1,6x10 <sup>-5</sup> mol/L	
<b>3-Hidroxi-Benzo[a]Pireno</b> 	13345-21-6	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O	3-Hidroxi-3,4-benzo[a]pireno 3-Hidroxi-benzo[a]pireno 3-Hidroxi-benzopireno	PM.: 268 g Pto.fus.: 227°C Sol.: 8,4x10 <sup>-7</sup> mol/L	

## **1.4. MATERIAL DE LABORATORIO**

- Viales de vidrio ámbar de 40 mL de capacidad provistos de tapones de rosca con septum de silicona recubierto de teflón (SUPELCO). Empleados en la extracción de las muestras.
- Viales de vidrio ámbar de 2,0 mL de capacidad, provistos de tapones de rosca con septum de silicona recubierto de teflón e inserts de 0,35 mL (SUPELCO). Empleados para la inyección del eluato final de AcN.
- Micropipeta con precisión entre 500 y 5000  $\mu$ L (EPPENDORF). Empleada para la preparación de los patrones.
- Minicolumna de sílica Sep-Pack Plus (WATERS). Empleada en la purificación de las muestras.
- Mini columnas C18 Sep-Pack Plus (WATERS) utilizadas para purificar y concentrar las muestras de leches y estiércoles.
- Filtros Chromafil PET-45/25 (Macherey-Nagel) utilizados para la filtración de los extractos.
- Otro material de uso corriente en el laboratorio.

## **2. INSTRUMENTACIÓN**

### **2.1. SISTEMAS DE DETERMINACIÓN**

- Espectrofluorímetro (JASCO, FP-750) equipado con una lámpara pulsante de Xenón y cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor. Software SPECTRA MANAGER para WINDOWS, versión 1.24.00. Empleado para la realización de los espectros de excitación y de emisión de cada uno de los PAHs estudiados.
- Cromatógrafo de líquidos (TERMO SEPARATION PRODUCTS) equipado con: desgasificador de membrana, bomba (P-4000), inyector automático (AS-1000) provisto de horno y bucle de 50  $\mu$ L, columna (SUPELCO, SUPELCOSILT<sup>TM</sup> LC-PAH (25 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)) y detector de fluorescencia (JASCO, FP-1520). Software CHROM-CARD para WINDOWS, versión 3.1. Empleado para la determinación de PAHs y metabolitos.
- Cromatógrafo de líquidos (FINNIGAN SURVEYOR<sup>TM</sup>) equipado con bomba cuaternaria, inyector automático, desgasificador y horno para columnas, acoplado a un detector de espectrometría de masas con un triple cuadrupolo

TSQ Quantum Discovery triple equipado con una interfase de electrospray (Thermo Fisher Scientific). Software Xcalibur empleado para la confirmación de la identidad de los analitos.

## **2.2. OTROS INSTRUMENTOS**

- Liofilizador TELSTAR LyoAlfa6 con bomba de vacío de doble etapa. Empleado para la liofilización de las muestras de estiércol y moluscos bivalvos.
- Horno de gas doméstico (FAGOR, 2CF-540), con una potencia de 10.6 KW y temperatura máxima de 250° C. Empleado para el tostado de las muestras pan.
- Horno eléctrico doméstico (FAGOR, 5H-413X) con una potencia de 2,6KW y temperatura máxima de 250° C. Empleado para el tostado de las muestras de pan.
- Tostadora convencional (UFESA, TT7356 MATTINA). Empleada para el tostado de las muestras de pan.
- Mufla (PROETI, HD-230). Empleada para la incineración de las muestras de pan a 300 y 500 °C.
- Sonda térmica (SOLOMAT). Empleada en la medición de la temperatura durante el tostado.
- Ultrasonidos (SELECTA) y ASE 200 (DIONEX) equipado con celdas de acero de 11 mL, empleados para la extracción sólido/líquido de las muestras.
- Distribuidor de vacío (SUPELCO, VISIPREPTM 24). Empleado para facilitar la purificación de los extractos mediante extracción en fase sólida.
- Microbalanza (SALTER, HR-120) con cuatro decimales de precisión. Empleada para la preparación de patrones y en la pesada de las muestras.
- Centrífuga (SELECTA, MIXTASEL). Empleada para facilitar la separación de la muestra y el disolvente de extracción.
- Turbo Vap (CALIPER LifeSciences, Turbo Vap LV). Empleado para la evaporación de los eluatos de n-hexano.
- Empleado para la evaporación de los disolventes orgánicos.

### 3. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES PATRÓN

#### 3.1. DISOLUCIONES DE PAHs

A partir de los PAHs comerciales se prepararon disoluciones patrón madre de 100 mg/L para cada uno los PAHs seleccionados. Se utilizaron diferentes disolventes, dependiendo de la solubilidad del compuesto: acetonitrilo, n-hexano y una mezcla de acetonitrilo:tolueno (2:3) (**Tabla 5**). A partir de estas disoluciones madre y tras evaporar el disolvente a sequedad, se obtuvieron disoluciones patrón individuales de menor concentración (10 mg/L y 100 µg/L). La mezcla de dichas disoluciones dio lugar a la disolución que contiene los PAHs objeto de estudio, oscilando las concentraciones entre 10 y 700 µg/L, dependiendo de la sensibilidad del analito. A partir de ésta, y por dilución, se prepararon las disoluciones de trabajo en acetonitrilo. El intervalo de concentraciones para cada uno de los compuestos se recoge en la **Tabla 5**. Bajo refrigeración y en frascos de vidrio ámbar, tanto las disoluciones madre como las de trabajo se mantienen estables, al menos, dos años.

**Tabla 5.** Disolventes empleados en la preparación de la disolución madre de 100 mg/L y rango de concentraciones para cada PAH en las disoluciones de trabajo (µg/L).

Compuesto	Disolvente	Intervalos de Concentraciones
F	acetonitrilo	0,50-14
P	acetonitrilo	2,0-20
B[a]A	acetonitrilo	0,42-4,0
Chr	acetonitrilo	2,5-20
5-MChr	acetonitrilo	2,5-20
B[j]F	acetonitrilo	7,0-56
B[b]F	n-hexano	0,80-6,0
B[k]F	n-hexano	0,10-1,0
B[a]P	acetonitrilo	0,26-2,0
DB[a,l]P	n-hexano	3,0-24
DB[a,h]A	acetonitrilo:tolueno	0,91-7,0
B[ghi]P	acetonitrilo:tolueno	7,1-57
I[1,2,3-cd]P	n-hexano	4,0-29



### 3.1. DISOLUCIONES DE METABOLITOS DE PAHs

Para los dos metabolitos (3-OH-B[a]P y el 1-OH-P) se prepararon disoluciones madres de concentración 100 mg/L en acetonitrilo. A partir de ésta, se elaboró una disolución intermedia de concentración 100 µg/L. Finalmente y mediante dilución con acetonitrilo, se obtuvieron las disoluciones de trabajo, cuyas concentraciones oscilaron entre 1,0-10 µg/L y 0,5-8,0 µg/L, para el 3-OH-B[a]P y el 1-OH-P, respectivamente.

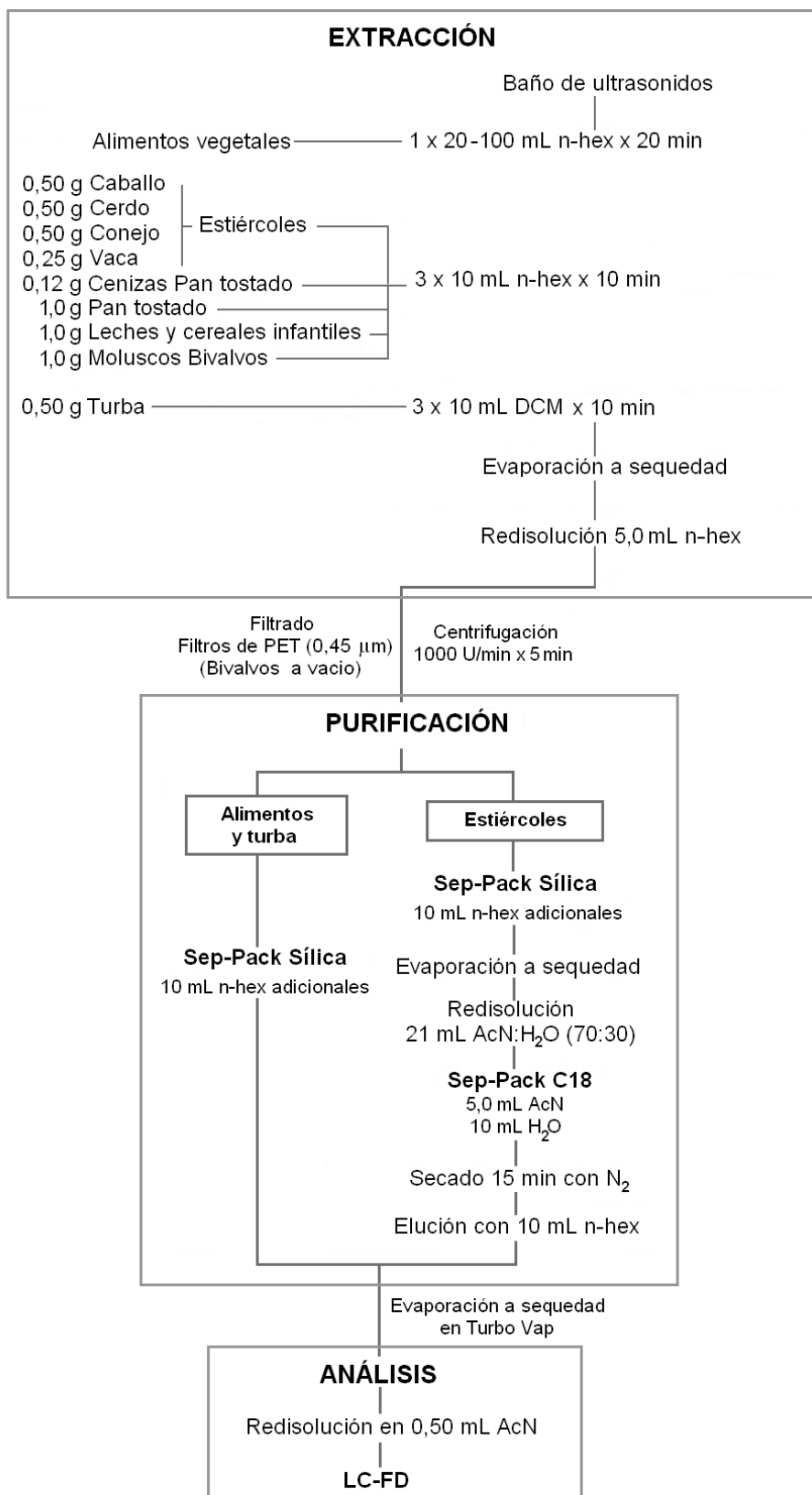
Para prevenir la oxidación de los analitos, a todas las disoluciones patrón se les incorporó tert-butil hidroquinona (TBHQ) como antioxidante (2,0 g/L) y se mantuvieron bajo refrigeración en frascos de vidrio ámbar. Bajo estas condiciones las disoluciones madre permanecerán estables durante, al menos, tres meses. Las disoluciones de trabajo se recomienda prepararlas cada dos o tres semanas debido a que tienen concentraciones menores.

## 4. PROTOCOLOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PAHs Y SUS METABOLITOS

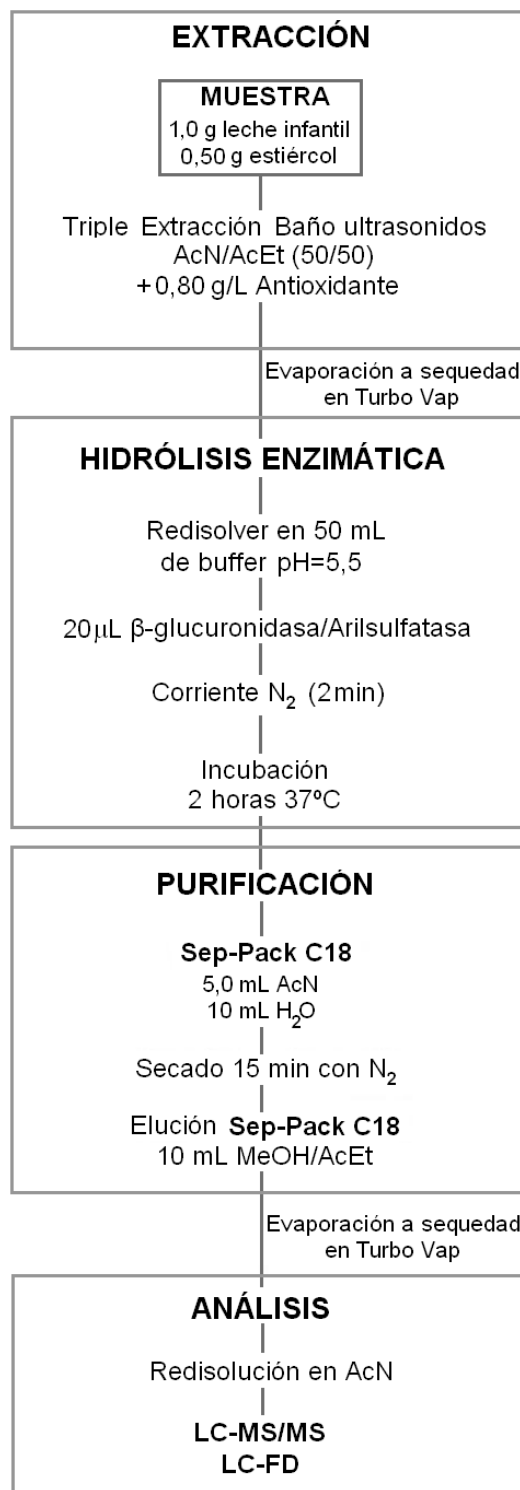
En las **Figuras 1 y 2** se esquematiza los protocolos generales de extracción y purificación para la determinación de los PAHs y sus metabolitos. Aún así, en cada capítulo del apartado de resultados y discusión se explicarán más pormenorizadamente los métodos analíticos empleados para cada matriz.

El eluato de acetonitrilo obtenido tras la purificación, se analiza cromatográficamente con las condiciones reflejadas en las **Tablas 6, 7, 8 y 9**. La concentración de cada PAH y metabolito,  $c(\mu\text{g/L})$ , se determinó a través de rectas de calibrado. Éstas se calcularon mediante análisis de regresión de las concentraciones de diferentes disoluciones patrón (**Tabla 10**), frente a las áreas de los picos cromatográficos. Para ello, los patrones de cada compuesto se inyectaron directamente en columna. Para expresar los resultados en  $\mu\text{g/Kg}$ , se aplicó la ecuación que se muestra a continuación, siendo  $V_f$  el volumen del eluato final de acetonitrilo y  $m$ , la cantidad de muestra pesada expresada en gramos.

$$c(\mu\text{g} / \text{Kg}) = \frac{c(\mu\text{g} / \text{L}) \times V_f(\text{mL})}{m(\text{g})}$$



**Figura 1.** Protocolo analítico para la determinación de PAHs en muestras sólidas.



**Figura 2.** Protocolo analítico para la determinación de metabolitos de PAHs en muestras de leche y estériles.

**Tabla 6.** Condiciones cromatográficas para la determinación de PAHs.

Determinación de PAHs	
Parámetros LC-FD	
Volumen inyección	50 µL
Tipo columna	SUPELCOSIL™ LC-PAH.
Temperatura	33 °C
Fase móvil	Disolvente A: 80%ACN Disolvente B: 20% H <sub>2</sub> O
Flujo	1,0 mL/min
Ganancia	100/1000
Slit	40 nm
Gradiente de elución	80-95% A en 40 min
	80% A en 1 min
	80% A durante 10 min

**Tabla 7.** Condiciones cromatográficas para la determinación de metabolitos de PAHs.

Determinación de metabolitos		
	Parámetros LC-MS/MS	Parámetros LC-FD
Inyección	20 µL	50 µL
Columna	Luna C8, 5,0µm 150x2,00 mm	SUPELCOSIL™ LC-PAH 5,0µm 250x4,6 mm
Temperatura	40 °C	40 °C
Fase móvil	Disolvente A: 40%ACN	Disolvente A: 50%ACN
	Disolvente B: 60% H <sub>2</sub> O	Disolvente B: 50% H <sub>2</sub> O
Flujo	0,25 mL/min	1,0 mL/min
Ganancia	-	1000
Slit	-	40nm
Gradiente	40 % A durante 2,0 min	50 % A durante 3,0 min
	75 % A en 2,0 min	70 % A en 3,0 min
	75 % A durante 4,0 min	70 % A durante 4,0 min
	98 % A en 2,0 min	95 % A en 2,0 min
	98% A durante 5,0 min	95 % A durante 6,0 min
	40 % A en 0,10 min	50 % A en 0,10 min
	40 % A durante 10 min	50 % A durante 10 min

**Tabla 8.** Programa de detección para el detector de FD.

Condiciones detector FD				
Compuesto	Intervalo tiempo (min)	$\lambda$ ex.	$\lambda$ em.	TR (min)
F	0,0-9,0	284	464	8,0
P	9-11	334	377	10
B[a]A	11-15	274	414	12
Chr				13
5-MChr				14
B[j]F	15-17	317	482	16
B[b]FA	17-23	300	446	18
B[k]FA				21
B[a]P	23-30	296/393 <sup>a</sup>	406/453 <sup>a</sup>	24
DB[a,l]P				27
DB[a,h]A				28
B[ghi]P	30-40	300	470	32
I[1,2,3-cd]P				35
1-OH-P	0,0-12	346	389	11
3-OH-B[a]P	12-25	308	432	16

a: longitudes de onda específicas para la cuantificación del DB[a,l]P

**Tabla 9.** Programa de detección para el detector de MS/MS.

Condiciones detector MS/MS			
Voltaje del capilar	3500 V		
Temperatura del capilar	350 °C		
Presión de N <sub>2</sub>	35		
Presión de N <sub>2</sub> auxiliar	5		
Compuestos	Reacciones de transición (m/z)	Energía de colisión (eV)	TR (min)
1-OH-P	217 - 189	35	11,53
3-OH-B[a]P	269 - 239	42	12,74

**Tabla 10.** Pendiente e intervalo de concentraciones de las rectas de calibrado obtenidas para la cuantificación de los PAHs y metabolitos objeto de estudio ( $\mu\text{g/L}$ ).

PAHs	Pendiente	Intervalo de concentraciones
F	12192889	0,5-14
P	9092095	2,0-20
B[a]A	37429372	0,20-4,0
Chr	6760852	1,5-20
5-MChr	10754507	2,5-20
B[j]F	1761059	4,0-56
B[b]F	24683011	0,5-6,0
B[k]F	142157335	0,10-1,0
B[a]P	57322619	0,15-2,0
DB[a,l]P (296/406 nm)	6059134	1,0-24
DB[a,l]P (393/453 nm)	7522030	1,0-24
DB[a,h]A	39114475	0,50-7,0
B[ghi]P	3869302	3,5-57
I[1,2,3-cd]P	6758442	2,0-29
1-OH-P	11133139	1,0-10
3-OH-B[a]P	23303169	0,50-6,0

## Capítulo I

---





## Evaluación de la contaminación medioambiental: Determinación de PAHs en turba

Las turberas son formaciones que van creciendo por acumulación de restos vegetales en terrenos húmedos. Las bajas temperaturas de las zonas donde se ubican, unido a la anoxia y la acidez de sus aguas intersticiales, provocan una reducida actividad microbiana, lo que hace que los restos vegetales no se descompongan o lo hagan muy lentamente, de manera que las plantas se depositan unas sobre otras y así va aumentando el espesor del depósito. Muchas turberas han ido acumulando turba desde el final de la última Edad de Hielo, ofreciendo así la oportunidad de construir registros continuos de hasta 15000 años. Debido a su elevado contenido en materia orgánica, las turbas tienen una gran capacidad para retener contaminantes ambientales (metales pesados, policlorobifenilos, dioxinas o hidrocarburos aromáticos policíclicos), minimizando además su movilidad o alteración diagenética tras la deposición [**Berset y col., 2001; Martínez-Cortizas y col., 2005**]. Las turberas reciben compuestos químicos única y exclusivamente de la atmósfera y no se ven afectados por las aguas superficiales ni subterráneas. Por todo ello, estas formaciones se comportan como verdaderos “archivos naturales” permitiendo reconstruir la contaminación medioambiental a lo largo de la historia y revelando como ha ido variando el contenido de cada contaminante en relación a las actividades humanas o los fenómenos naturales.

La mayoría de los PAHs emitidos a la atmósfera tienen un origen antropogénico, generándose como resultado de la pirólisis de combustibles fósiles u otro tipo de materia orgánica como madera, restos, basuras, etc. Aún así estos contaminantes también pueden tener un origen natural, liberándose en las erupciones volcánicas o en incendios forestales espontáneos. Una vez en el medio aéreo, los PAHs pueden viajar en fase vapor o ligados a partículas, siendo transportados a miles de kilómetros antes de ser depositados por vía seca o húmeda, a la superficie terrestre. De ahí que aunque los sondeos de este trabajo se hayan realizado en una sierra de la provincia de Lugo, los resultados se pueden extrapolar no sólo a la comunidad Gallega, sino a toda la Península Ibérica o incluso áreas más alejadas.

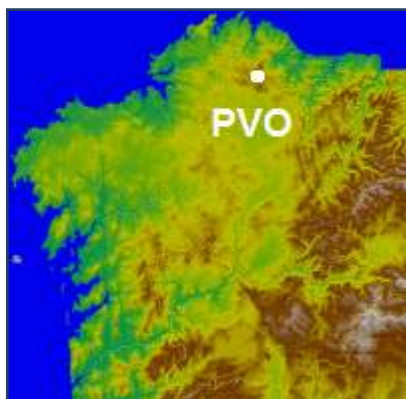
En este estudio, se ha seleccionado la turbera ombrotrofica de Penido Vello (PVO) localizada en la sierra de O Xistral (Lugo) a 20 km al sur de la costa, para evaluar la carga histórica de PAHs atmosféricos desde 1076 hasta 1990 (**Figura 1**).

---

Berset, J. D.; Kuehne, P.; Shotyk, W., 2001. Science of the Total Environment, 267, 67-85.

Martínez Cortizas, A.; García-Rodeja, E.; Pontevedra Pombal, X.; Nóvoa Muoz, J.C.; Weiss, D.; Cheburkin, A., 2002. Science of the Total Environmental, 292 (1-2), 33-44.

## 1. MUESTREO



**Figura 1.** Localización de la turbera de Penido Vello en la Sierra de O Xistral.

La turbera de PVO forma parte de un extenso y complejo ecosistema húmedo, situado a 700 m sobre el nivel del mar. Se sitúa en la cima aplanada de un macizo granítico, y yace directamente sobre la roca o sobre material periglaciario. La temperatura media anual de la zona oscila entre 10 y 7,5° C y la precipitación anual entre 1350 y 1700 mm, con un intenso gradiente ascendente de la precipitación en dirección norte sur.

Las muestras de turba fueron facilitadas por el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela. La turbera se recolectó en zanja y con una sonda Bielorrusa (**Figura 2**), previo acondicionamiento de un frente abierto, hasta alcanzar los 250 cm de profundidad. La turba se cortó en el campo y se envolvió en papel de aluminio y plástico alimentario por bloques de 25x25x25 cm para su transporte. Ya en el laboratorio, se separó la capa más superficial y se seccionaron los bloques de muestra fresca cada 2 cm de grosor el primer metro y, cada 5 cm por debajo del metro superficial. En este trabajo se analizarán 21 muestras de turba, las correspondientes a los 40cm más superficiales.

Cada una de estas muestras fue datada radiocarbónicamente (**Tabla 5**), siendo la edad de la turba más profunda (40 cm) de 1075 años d.C. También se analizó una muestra recogida a 152 cm de profundidad (400 a.C.) para medir los niveles de fondo de PAHs, debidos fundamentalmente a fenómenos de contaminación de origen natural. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado, y tras ser molidas, se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo que se mostrará a continuación.



**Figura.2.** a) Momento de la toma de muestra. b) Muestra de turba recogida con una sonda Bielorrusa.

## 2. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El grupo de investigación en el que me integré para la realización de esta Tesis Doctoral, lleva varios años trabajando en la determinación de 8 PAHs (F, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[ghi]P e I[1,2,3-cd]P) en distintas matrices alimentarias y medioambientales [**García-Falcón y col., 1996 y 2005; Rey-Salgueiro y col., 2004; García-Falcón y Simal-Gándara, 2005**]. El protocolo analítico aplicado en el presente trabajo para el análisis de las turbas, será una adaptación de estos métodos, con la particularidad de que en este caso, se amplió el número de analitos a 13 (F, P, B[a]A, Chr, 5-MChr, B[j]F, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,i]P, DB[a,h]A, B[ghi]P e I[1,2,3-cd]P).

De los 15 PAHs designados por el Comité Científico de la Alimentación Humana como posibles residuos cancerígenos (Figura 1 de la Introducción) [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**], 11 de ellos son objeto de estudio en este trabajo. El Ciclopenta[cd]P se ha descartado por no ser fluorescente y se ha seleccionado el DB[a,i]P como representante de los 4 isómeros, DB[a,h]P, DB[a,i]P, DB[a,e]P, DB[a,l]P, por ser el más cancerígeno [**Cavalieri y col, 1989 y , 1991; LaVoie y col., 1993; Devanesan y col., 1999**]. Aunque no hay evidencias de las propiedades cancerígenas y genotóxicas del F y el P, han sido seleccionados ya que se emplean habitualmente como marcadores de contaminación medioambiental [**Sanders y col., 1995; Fernández y col., 2000**].

A continuación se comentarán los aspectos relacionados con la determinación analítica de los cinco nuevos compuestos estudiados. Además, y teniendo en cuenta la gran capacidad de las turbas para absorber a los PAHs

---

**García Falcón, M.S.; López de Alda Villaizán, M.J.; González Amigo, S.; Simal Lozano, J.; Lage Yusty, M. A., 1996.** Journal of Chromatography, 753, 207-215.

**García-Falcón, M.S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J., 2005.** Food Chemistry, 90, 643-647.

**Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2004.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3900-3904.

**García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J., 2005.** Food Additives and Contaminants, 22(1), 1-8.

**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002.** Opinion of the science committee on food on the risk to human health of PAHs-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

**Cavalieri, E.L.; Rogan, E.G.; Higginbotham, S.; Cremonesi, P.; Salmasi, S., 1989.** Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 115 (10), 67-72.

**Cavalieri, E.L.; Higginbotham, S.; RamaKrishna, N.V.S.; Devesan, P.D.; Todorovic, R.; Rogan, E.G, 1991.** Carcinogenesis, 16 (12), 3031-3036.

**LaVoie, E.J.; He, Z.-M.; Meegalla, R.L.; Weyand, E.H., 1993.** Cancer Letters, 70 (1-2), 7-14.

**Devanesan, P.; Ariese, F.; Jankowiak, R.; Small, G.J.; Rogan, E.G.; Cavalieri, E.L., 1999.** Chemical Research in Toxicology, 12 (9), 789-795.

**Sanders, G.; Jones, K. C.; Hamilton-Taylor, J.; Dorr, H., 1995.** Environmental Pollution, 89, 17-25.

**Fernández, P.; Vilanova, R.M.; Martinez, C.; Appleby, P.; Grimalt, J.O., 2000.** Environmental Science and Technology, 34 (10), 1906-1913.

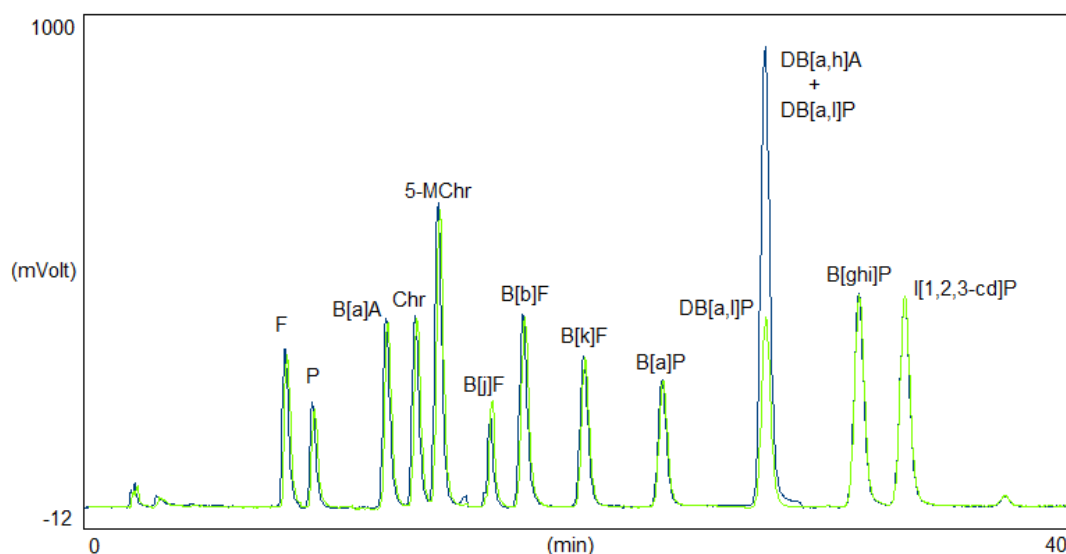
debido a su elevado contenido en materia orgánica, se prestará especial atención a la etapa de extracción.

## 2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN

La determinación cromatográfica de los PAHs en las diferentes muestras se llevó a cabo utilizando HPLC-FD, con las condiciones reflejadas en las Tablas 6 y 8 de la Parte Experimental.

Para establecer las longitudes de onda de detección óptimas de los nuevos compuestos analizados, se emplearon sus espectros de excitación y emisión, obtenidos mediante espectrofluorimetría (Tabla 4 de la Parte Experimental).

Aplicando el gradiente reflejado en la Tabla 6 de la Parte Experimental, se consiguió resolver satisfactoriamente en un solo cromatograma, todos los PAHs salvo dos, el DB[a,l]P y el DB[a,h]A (**Figura 3**). Para poder cuantificar cada compuesto por separado fue necesario seleccionar unas longitudes de onda de excitación y emisión, a las que solamente presentase absorbancia uno de los analitos.



**Figura 3.** Cromatogramas correspondientes a un patrón de PAHs inyectado con las condiciones de detección a las cuales presentan absorbancia el DB[a,l]P y el DB[a,h]A (trazo azul) y con las condiciones específicas para la cuantificación del DB[a,l]P (trazo verde).

Como se recoge en la **Figura 3**, ambos compuestos absorben a 296/406 nm, en cambio con 393/453, se consigue anular la absorbancia del DB[a,h]A. De manera que, si en la muestra a analizar se presentasen los dos compuestos, sería necesaria una doble inyección. En el cromatograma obtenido a 393/453 nm, y empleando una recta de calibrado elaborada con

patrones de DB[a,l]P, se cuantificaría directamente este compuesto (Tabla 10 de la Parte Experimental). Para cuantificar el DB[a,h]A habría que emplear el cromatograma obtenido a 296/406 nm, restar a la señal de ambos compuestos la aportación del DB[a,l]P a estas longitudes de onda y aplicar la recta de calibrado obtenida con patrones puros de DB[a,h]A a 296/406 nm (Tabla 10 de la Parte Experimental).

## 2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN

En la **Tabla 5** se muestra el contenido de materia orgánica de las 22 muestras de turba (datos facilitados por el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela). Como se puede observar, los niveles de materia orgánica son muy elevados oscilando entre el 90 y el 98 %. Las características de los PAHs (baja solubilidad en agua y baja polaridad) los convierten en componentes con alta capacidad para ser adsorbidos por la materia orgánica de los suelos y turbas [**García-Falcón y col., 2004; Dreyer y Radke, 2005**].

En general, y por razones de simplicidad, la materia orgánica se divide en sustancias húmicas y no húmicas. Las sustancias no húmicas incluyen carbohidratos, péptidos, aminoácidos, proteínas, grasas, ceras, alcanos y ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Muchos de estos compuestos son fácilmente atacados por microorganismos y pueden tener una corta permanencia en el suelo. Las sustancias húmicas, que constituyen la mayor proporción de la materia orgánica de las turbas, no pertenecen a una única categoría y no se les puede asignar una estructura determinada. Por esta razón son definidas en función de su solubilidad en ácidos, bases y alcohol, diferenciándose:

- Ácidos húmicos. Es la fracción de sustancias insolubles en agua a valores de pH menores de 2, pero que se solubilizan al elevar el pH.
- Ácidos fúlvicos. Es la fracción soluble en agua a todos los pHs.
- Humina. Es la fracción insoluble tanto en condiciones ácidas como alcalinas.
- Ácidos himatomelánicos. Mezcla compleja de sustancias solubles en alcohol.

Los PAHs tienden a ligarse a la fracción húmica, especialmente a los ácidos húmicos y a los fúlvicos. Esta adsorción es directamente proporcional al contenido en materia orgánica y al peso molecular de los PAHs [**García-Falcón y col., 2004**].

---

García-Falcón, M.S.; Pérez-Lamela, C.; Simal-Gándara, J., 2004. *Analytica Chimica Acta*, 508 (2), 177-183.

Dreyer, A.; Radke, M., 2005. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85 (7), 423-432.

García-Falcón, M.S.; Pérez-Lamela, C.; Simal-Gándara, J., 2004. *Analytica Chimica Acta*, 508 (2), 177-183.

Desde el punto de vista analítico, la capacidad adsorbente de este tipo de matrices, dificulta en gran medida la extracción de los PAHs. Por ello, en este trabajo se han evaluado diferentes disolventes y técnicas de extracción con el objetivo de maximizar la extracción de estos residuos de las muestras de turba.

### 2.2.1. Selección del disolvente de extracción

Los disolventes comúnmente empleados para la extracción de PAHs en suelos y turbas incluyen el n-hexano, n-hexano:acetona (2:1) y diclorometano [Berset y col., 2001; Dreyer y Radke, 2005; Dreyer y col., 2005; Masih y col., 2006; Richter y col., 2006]. Aún así, autores como Rey-Salgueiro y col., 2004, García Falcón y col., 2006 y Xue y col., 2007, en cuyos trabajos se evalúan diferentes disolventes apolares para la extracción de PAHs en muestras con alto contenido de material adsorbente, han puesto de manifiesto que el diclorometano es, con diferencia, el que tiene mayor poder de extracción.

En el presente trabajo se estudió la capacidad de diferentes disolventes, para extraer los PAHs de una muestra de turba superficial (2cm de profundidad). Se realizaron ensayos con n-hexano:acetona (2:1), n-hexano, diclorometano y mezcla de ambos en diferentes proporciones (95:5; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50). La muestra fue procesada siguiendo el protocolo que se recoge en la **Figura 4**.

La mezcla de n-hexano:acetona (2:1) se descartó porque los extractos obtenidos eran muy sucios, incluso tras su purificación a través de sílica. En la **Tabla 1** se puede observar como la extracción de PAHs es mayor a medida que se incrementa la proporción de diclorometano, obteniéndose los mejores resultados cuando se emplea este disolvente puro. Por ello, y aún a pesar de su toxicidad, éste fue el disolvente seleccionado para el análisis de las muestras de turba.

- 
- Berset, J. D.; Kuehne, P.; Shotyk, W., 2001. Science of the Total Environment, 267, 67-85.
- Dreyer, A.; Radke, M., 2005. Journal of Environmental Analytical Chemistry, 85 (7), 423-432.
- Dreyer, A.; Radke, M.; Turunen, J.; Blodau, C., 2005. Environmental Science and Technology, 39 (11), 3918-3924.
- Masih, A., Taneja, A., 2006. Chemosphere, 65 (3), 449-456.
- Richter, P.; Jiménez, M.; Salazar, R.; Maricán, A., 2006. Journal of Chromatography A, 1132 (1-2), 15-20.
- Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2004. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52, 3900-3904.
- García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2006. Environmental Science and Technology, 40, 759-763.
- Xue, J.; Liu, G.; Niu, Z.; Chou, C.-L.; Qi, C.; Zheng, L.; Zhang, H., 2007. Energy and Fuels, 21 (2), 881-890.

**Tabla 1.** Evaluación del n-hexano, diclorometano (DCM) y mezcla de ambos en diferentes proporciones como disolventes de extracción de PAHs en turbas ( $\mu\text{g/Kg}$ ,  $n=2$ ).

PAHs	n-hex	n-hex:DCM					DCM
		95:5	80:20	70:30	60:40	50:50	
F	11	21	24	23	26	33	39
P	9,0	15	15	24	23	24	29
B[a]A	1,20	0,88	2,1	2,9	3,4	3,9	7,9
Chr	0,060	2,0	3,4	4,1	4,7	5,5	11
5-MC	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
B[j]F	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
B[b]F	1,3	2,3	3,7	5,0	5,6	5,9	9,9
B[k]F	0,40	0,70	1,1	1,5	1,8	2,0	3,1
B[a]P	0,17	0,14	0,42	0,47	0,68	0,82	0,9
DB[a,l]P	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
DB[a,h]A	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
B[ghi]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
I[1,2,3-cd]P	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
$\Sigma$ PAHs	23	42	50	61	65	75	101

nc: no cuantificable, nd: no detectable

### 2.2.2. Selección de la técnica de extracción

Se evaluaron dos técnicas de extracción sólido/líquido rápidas y sencillas, extracción asistida por ultrasonidos y extracción acelerada con disolventes (ASE). La extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos, es una técnica ya empleada por el grupo de investigación para la determinación de PAHs en muestras medioambientales (cenizas y suelos), obteniéndose resultados satisfactorios [Rey-Salgueiro y col., 2004; García-Falcón y col., 2006]. La extracción en ASE es una técnica novedosa y automatizable, que permite utilizar pequeños volúmenes de disolvente y trabajar a presiones y temperaturas elevadas. Al incrementar la temperatura se acelera la cinética de extracción, facilitándose la disolución de los analitos. Las altas presiones logran mantener el disolvente por debajo de su punto de ebullición. Ésta es una técnica habitualmente utilizada para la extracción de PAHs en diferentes

Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2004. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3900-3904.

García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J.; 2006. Environmental Science and Technology, 40, 759-763.

matrices como suelos, sedimentos o turbas [Dreyer y Radke, 2005; Dreyer y col., 2005; Ran y col., 2007; Nagy y col., 2008].

Para realizar este ensayo se empleó una muestra de turba recogida a 6 cm de profundidad, que fue extraída tanto por ASE (n=3) como por ultrasonidos (n=3), empleando diclorometano como disolvente. En el caso de la extracción asistida por ultrasonidos, la muestra se extrae tres veces consecutivas empleando alícuotas de 10 mL de disolvente en cada una de ellas. La extracción aplicando ASE se realiza por contacto directo de la muestra con el disolvente en caliente, tanto en modo estático como dinámico. Una vez completada la extracción, el disolvente es expulsado fuera de la celda mediante nitrógeno comprimido y se recoge en un vial. Este proceso se repite cinco veces (5 ciclos) (**Tabla 2**). El eluato final de diclorometano se somete al mismo protocolo de purificación que en el caso anterior (**Figura 4**).

**Tabla 2.** Condiciones de extracción en ASE.

Parámetros	
Temperatura	120°C
Presión	2000 psi
Nº ciclos	5
Flush volumen	60 %
Tiempo de purga	60 s
Tiempo estático	5 min
Tiempo en el horno	5 min

Como se puede observar en la **Tabla 3**, los resultados obtenidos con ambas técnicas de extracción son similares. Finalmente y por comodidad, para analizar las muestras de turba se ha seleccionado la extracción asistida por ultrasonidos, ya que para emplear el ASE habría que recurrir a los servicios del “Centro de Apoyo Científico y Tecnológico a la Investigación” (C.A.C.T.I) de la Universidad de Vigo”.

Es de destacar que el empleo de diclorometano como extractante, obliga a evaporar a sequedad este disolvente y redissolver el extracto en n-hexano, antes de su purificación a través de minicolumnas de sílica. Esto se debe a que

---

Dreyer, A.; Radke, M., 2005. Journal of Environmental Analytical Chemistry, 85 (7), 423-432.

Dreyer, A.; Radke, M.; Turunen, J.; Blodau, C., 2005. Environmental Science and Technology, 39 (11), 3918-3924.

Ran, Y., Sun, K., Ma, X., Wang, G., Grathwohl, P., Zeng, E.Y., 2007. Environmental Pollution, 148 (2), 529-538.

Nagy, P.; Fekete, J.; Sharma, V.K., 2008. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 31 (2), 240-249.

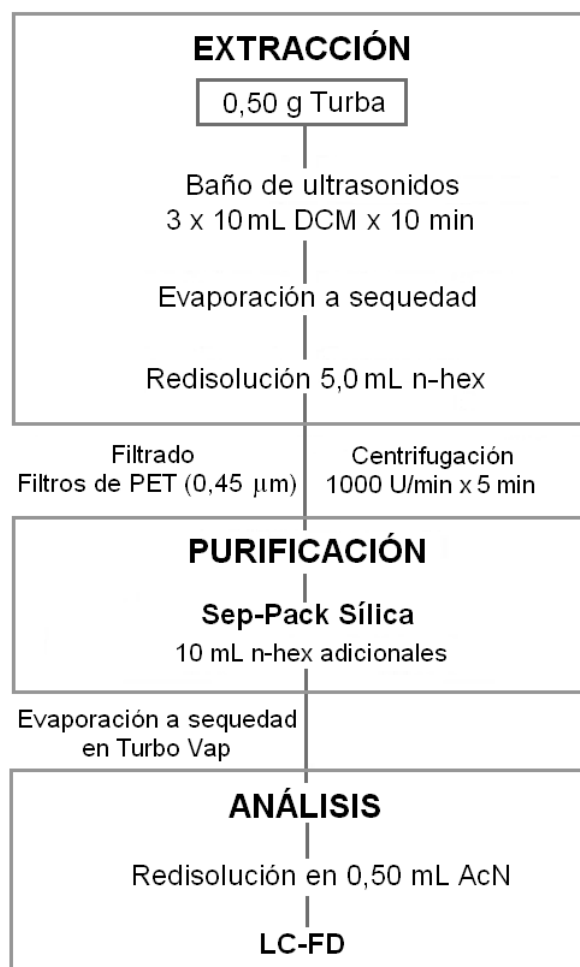


el diclorometano es un disolvente con un gran poder de elución, de manera que las impurezas eluyen libremente y no son retenidas por el adsorbente. En cambio, al sustituir el diclorometano por n-hexano, se consigue la retención selectiva de estas impurezas.

**Tabla 3.** Comparación de dos técnicas de extracción: ASE y asistida por baño de ultrasonidos.

PAHs	ASE	Ultrasonidos
<b>F</b>	<b>56 ± 3,0</b>	<b>54 ± 0,35</b>
<b>P</b>	<b>31 ± 0,53</b>	<b>35 ± 2,5</b>
<b>B[a]A</b>	<b>7,0 ± 0,40</b>	<b>6,8 ± 0,011</b>
<b>Chr</b>	<b>9,5 ± 0,80</b>	<b>8,4 ± 0,30</b>
<b>5-MChr</b>	nc	nc
<b>B[<i>l</i>]F</b>	nc	nc
<b>B[<i>b</i>]F</b>	<b>9,2 ± 0,70</b>	<b>11 ± 0,11</b>
<b>B[<i>k</i>]F</b>	<b>3,1 ± 0,25</b>	<b>8,4 ± 0,30</b>
<b>B[<i>a</i>]P</b>	<b>1,6 ± 0,34</b>	<b>1,3 ± 0,10</b>
<b>DB[<i>a</i>,<i>l</i>]P</b>	nc	nc
<b>DB[<i>a</i>,<i>h</i>]A</b>	nc	nc
<b>B[<i>ghi</i>]P</b>	<b>5,0 ± 0,94</b>	<b>6,6 ± 0,53</b>
<b>I[1,2,3-<i>cd</i>]P</b>	<b>6,0 ± 1,0</b>	<b>3,8 ± 0,32</b>
<b>ΣPAHs</b>	<b>128</b>	<b>131</b>

En la **Figura 4** se muestra el esquema final, del protocolo empleado para el procesado de las muestras de turba.



**Figura 4.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de turba.

## 2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El % de recuperación se estimó comprobando el remanente de PAHs que permanecen en la turba, después de ser sometida al procedimiento analítico seleccionado. Para ello, el residuo obtenido después de procesar una muestra, se reextrae con 10 mL de diclorometano, determinando los niveles de PAHs en este extracto. El porcentaje de PAHs remanente osciló entre el 5,0 % para el F y el 8,0 % para el B[b]F. Pudiendo concluir que el porcentaje de recuperación se encuentra entre el 92 y el 95%.

Para evaluar la precisión (% RSD) del método, se analizaron por triplicado dos muestras de turba, una superficial (6 cm de profundidad) con elevada carga contaminante (131 µg/kg) y otra profunda (40 cm de profundidad), con niveles de PAHs mucho menores (39 µg/kg). Los %RSD obtenidos en la primera muestra oscilaron entre el 1,0 y el 8,0 %, para el B[a]A y el B[a]P, respectivamente. En el caso de la muestra más profunda, los %RSD fueron más elevados, variando del 1,0 % (F) al 17 % (Chr).

La linealidad se chequeó a través de las rectas de calibrado, calculadas para cada PAH mediante análisis de regresión de las concentraciones de las diferentes disoluciones patrón, frente a las áreas de los picos obtenidos, al inyectar estas muestras directamente en el HPLC-FD. Los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) oscilaron entre 0,9983 para el DB[a,h]P y 0,9999 para el F. Una vez comprobado que el método propuesto es válido para la extracción de PAHs en las muestras objeto de estudio, se determinaron los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) (**Tabla 4**). Para ello se siguieron los principios de la ACS [ACS, 1980].

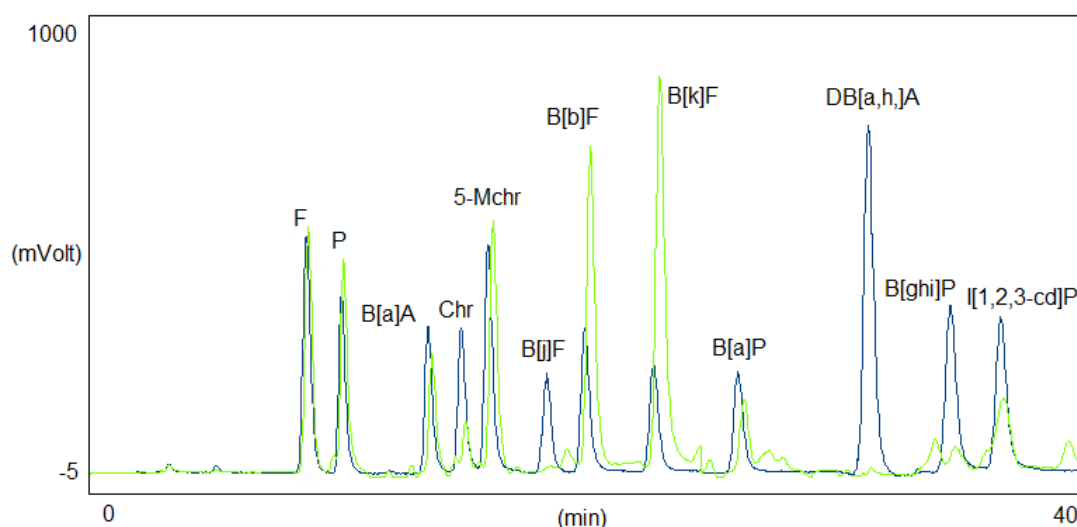
$$LD = \bar{x} + 3 DS$$

$$LC = \bar{x} + 10 DS$$

**Tabla 4.** Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en turba ( $\mu\text{g/Kg}$ ,  $n=6$ ).

PAHs	LD	LC
F	0,16	0,5
P	0,30	2,0
B[a]A	0,080	0,20
Chr	0,50	1,5
5-MChr	0,25	0,70
B[j]F	1,3	3,5
B[b]F	0,20	0,50
B[k]F	0,020	0,050
B[a]P	0,050	0,15
DB[a,h]P	0,33	1,0
DB[a,h]A	0,20	0,50
B[ghi]P	1,4	3,5
I[1,2,3-cd]P	0,70	2,0

En la **Figura 5** se recogen los cromatogramas de una muestra de turba y un patrón de PAHs.



**Figura 5.** Cromatogramas correspondientes a una muestra de turba (nº 6) (trazo verde) y a un patrón de PAHs con un rango de concentraciones de 0,40-28µg/L (trazo azul).

### 3. NIVELES DE PAHs EN LAS MUESTRAS DE TURBA.

Se ha calculado el nivel de contaminación de fondo por PAHs, determinando el contenido de estos residuos en una muestra muy profunda de turba (a 152cm de la superficie) datada en el año 400 a.C. Asumiendo que en esta época la actividad antropogénica sería mínima, los residuos encontrados (28 µg/kg) procederían exclusivamente de causas naturales, como incendios espontáneos o erupciones volcánicas. Se asume, por tanto, que en aquellos puntos de la turbera en los que los niveles de PAHs superen este valor, se deberá básicamente a causas antropogénicas. También se pudo comprobar que todos los PAHs encontrados en la turbera proceden exclusivamente de la deposición atmosférica, descartándose cualquier otro origen, como vertidos accidentales de petróleo, aceites minerales, etc. Se ha llegado a esta conclusión calculando los siguientes ratios:  $F/(F+P)$  y  $B[a]A/(B[a]A+Chr)$ , los resultados obtenidos oscilaron entre 0,52 - 0,65 y 0,35 - 1,0, respectivamente. De acuerdo con **Yunker y col., 2002**, ratios de  $F/(F+P) > 0,50$  y  $B[a]A/(B[a]A+Chr) > 0,35$  denotan combustión, ya sean de combustibles fósiles u otro tipo de materiales como madera, carbón o rastrojos.

En la **Tabla 5** se representan los niveles totales de PAHs encontrados a lo largo de los 40 cm de la turbera, los cuales se corresponden con el periodo histórico que se extiende desde el año 1075 hasta el año 1990. Abarcando la Baja Edad Media (s. XI-XV), la Edad Moderna (desde el s. XVI hasta la

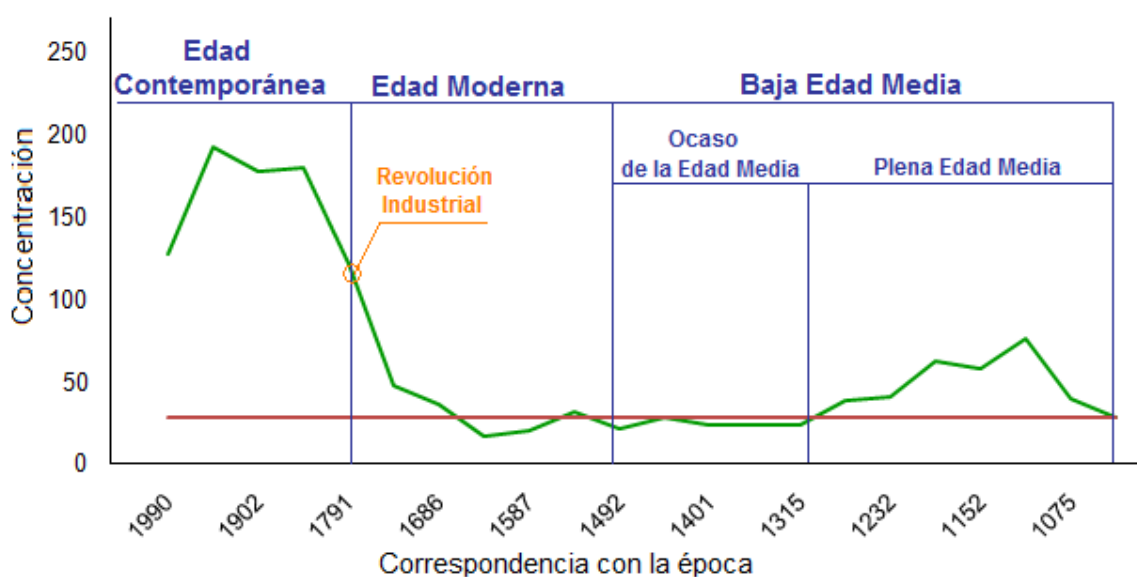
segunda mitad del s. XVIII) y la Edad Contemporánea, cuyo inicio coincide con la Revolución Industrial (entre los años 1760-1780).

**Tabla 5.** Contenido de materia orgánica y niveles de PAHs totales en los diferentes estratos de la turbera de Penido Vello ( $\mu\text{g/Kg}$ ,  $n=2$ ).

Muestra	Profundidad	Correspondencia con la época	Materia orgánica	$\Sigma\text{PAHs}$
1	0	1990	90	126
2	2	1960	91	191
3	4	1902	91	177
4	6	1846	92	179
5	8	1791	91	120
6	10	1738	91	47
7	12	1686	94	36
8	14	1635	95	21
9	16	1587	95	20
10	18	1539	95	31
11	20	1492	95	21
12	22	1446	96	28
13	24	1401	96	23
14	26	1358	96	23
15	28	1315	97	23
16	30	1273	97	38
17	32	1232	97	40
18	34	1192	97	61
19	36	1152	97	57
20	38	1114	97	75
21	40	1075	98	40
22	152	400 a.C.	99	28

En la **Figura 6** se muestran los mismos datos y, además, mediante una línea roja, el nivel de contaminación de fondo de PAHs ( $28 \mu\text{g/kg}$ ). Hay notables diferencias en la carga de PAHs a lo largo de los 40 cm de la turbera, observándose claramente dos épocas en las que las concentraciones de estos residuos, superan la contaminación de fondo. Una de ellas se extiende entre los años 1075-1315 y la otra entre el 1635-1990. Destacar que **Martínez-**

**Cortizas y col., 2002**, Encontraron un perfil semejante a este, al estudiar la evolución de la contaminación por plomo en esta misma turbera. Tratar de explicar a qué se deben estos dos máximos no es tarea fácil, ya que no existe ningún estudio semejante a este, en ninguna otra turbera de la Península Ibérica. Los pocos trabajos encontrados sobre el tema, se llevaron a cabo en turberas de Suiza, Canadá o Polonia [**Berset y col., 2001; Dreyer y col., 2005; Malawska y col., 2002**], donde se evaluó la contaminación por PAHs en épocas muy recientes, posteriores a la Revolución Industrial. Aún así, se tratará de dar una explicación histórica a las oscilaciones encontradas en los niveles de estos residuos.



**Figura 6.** Niveles totales de PAHs encontrados a lo largo de los 40 cm de la turbera

El primer gran repunte de PAHs se encuentra entre los años 1075-1315, coincidiendo con la época conocida como la Plena Edad Media (s. XI-XIII). Con la Plena Edad Media se pone fin en Europa a la denominada Edad Oscura de las Invasiones, y a un periodo especialmente frío. A partir del año 1000 tiene lugar un espectacular desarrollo a todos los niveles, demográfico, económico, social y cultural. Todo ello favorecido por una cálida bonanza climática denominada “óptimo medieval”. El aumento de la población, que llega a triplicarse en Europa, va acompañado de un apogeo de la agricultura, lo que conlleva que el campo gane terreno a los bosques. El desmonte de los bosques se realiza principalmente mediante quemas controladas. Se despierta

Martínez Cortizas, A.; García-Rodeja, E.; Pontevedra Pombal, X.; Nóvoa Muoz, J.C.; Weiss, D.; Cheburkin, A., 2002. *Science of the Total Environment*, 292 (1-2), 33-44.

Berset, J. D.; Kuehne, P.; Shotyk, W., 2001. *Science of the Total Environment*, 267, 67-85.

Dreyer, A.; Radke, M.; Turunen, J.; Blodau, C., 2005. *Environmental Science and Technology*, 39 (11), 3918-3924.

Malawska, M.; Bojakowska, I.; Wilkomirski, B., 2002. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165, 686-691.

también la actividad industrial, cobrando gran importancia la industria metalúrgica, como consecuencia del aumento de la demanda de metales. Hecho que coincide con la introducción de armas de fuego cada vez más pesadas y la elaboración de herramientas de hierro. Se producen grandes avances en la metalurgia del hierro o siderurgia, sobre todo en la fundición. Se estima que para fundir 1 tonelada de hierro eran necesarias 20 toneladas de madera. Todas estas actividades suponen la combustión de madera u otros materiales vegetales, lo que implica una importante generación de humos y, por tanto, un aumento de las principales fuentes de emisión de PAHs a la atmósfera.

Desde finales del s. XIII hasta finales del s. XV el nivel de PAHs se mantiene por debajo del nivel de fondo. Esta baja contaminación coincide con el Ocaso de la Edad Media, donde se produce un cambio en la estabilidad climática, acabando con el llamado óptimo medieval y dando paso a la denominada Pequeña Edad de Hielo. Como consecuencia, las malas cosechas condujeron a hambrunas que debilitaron físicamente a las poblaciones, preparando el terreno para que la Peste Negra de 1348 fuera una catástrofe demográfica en Europa, reduciendo la población en casi un tercio. Produciéndose, por tanto, un descenso de la actividad agrícola e industrial.

A partir del s. XVI comienza la Edad Moderna que trae consigo la recuperación de la población, el dinamismo económico y el nuevo vigor cultural. Algunos historiadores fijan como fecha de inicio el descubrimiento de América en 1492 hasta el inicio de la Revolución Francesa en el 1789. En torno al año 1500 se observa un pequeño y poco significativo, aumento del nivel de PAHs por encima de la contaminación de fondo, pero es a partir del 1635 cuando se produce un marcadísimo incremento de estos compuestos, coincidiendo con una serie de profundos cambios en los sistemas de trabajo y en la estructura de la sociedad que culminarán con la “Revolución Industrial”.

La Revolución Industrial, que tiene su origen en Gran Bretaña entre los años 1760-1780, es el resultado de un crecimiento y de unos cambios que se han venido produciendo en Europa durante los últimos cien años. Este periodo se caracterizó por progresos técnicos y científicos que tuvieron un enorme impacto en la estructura productiva y social. Como resultado de la invención de la máquina de vapor, surgen nuevos medios de transporte como el barco de vapor y el ferrocarril. A partir de aquí el carbón, en sustitución de la madera, se convierte en el combustible por excelencia tanto en la industria como en el transporte. Posteriormente, en la llamada Segunda Revolución Industrial, que tiene su inicio en torno al 1860, comienza el auge de los combustibles derivados del petróleo, como la gasolina, keroseno, gasóleo, etc. La contaminación derivada del empleo de todas estos combustibles fósiles, culmina con la mayor acumulaciones de PAHs en el año 1960. A partir de esta fecha los niveles de PAHs comienzan a caer progresivamente, probablemente debido a diversas razones como la sustitución del carbón por fuentes de

energía más limpias como el gas natural o la energía nuclear, la disminución de la industria pesada y la regulación de la contaminación del aire [**Feliu y Sudrià, 2007; Ocampo, 1998**].

**Sanders y col., 1995**, y **Berset y col., 2001**, estudiaron diferentes muestras de turba datadas en el s. XX, obtenidas de turberas del Reino Unido y Suiza, respectivamente. Estos autores también observaron un incremento de los niveles de PAHs en la época de la Revolución Industrial, disminuyendo la carga contaminante en las últimas décadas. En general, los niveles de PAHs totales encontrados en la turbera de PVO son similares a los hallados en turberas de Polonia y en un orden de magnitud inferior al de países más industrializados como Inglaterra, Suiza y Canadá (**Tabla 6**). Este resultado coincide con la mayoría de los estudios regionales sobre la deposición de PAHs. **Jones y col., 1989**, **Bucheli y col., 2004**, **García falcón y col., 2006**, encontraron mayores concentraciones de PAHs en suelos urbanos y más bajas en suelos de lugares remotos.

Estudios sobre la deposición de PAHs en lagos también mostraron las mismas relaciones [**Gschwend y Hites, 1981; Simcik y col., 1996**]. **Fernández y col., 2000**, determinaron bajas deposiciones de PAHs en un lago remoto del Ártico, sin embargo estas concentraciones aumentaron en lagos de las montañas de Tatra, al sur de Polonia, situadas cerca de áreas industriales.

---

**Feliu, G.; Sudrià, C., 2007.** Introducción a la historia económica mundial. Universitat de València.

**Ocampo, J.S-V., 1998.** Historia económica mundial y de España. Universidad de Oviedo. D.L.

**Sanders, G.; Jones, K. C.; Hamilton-Taylor, J.; Dorr, H., 1995.** Environmental Pollution, 89, 17-25.

**Berset, J. D.; Kuehne, P.; Shotyk, W., 2001.** Science of the Total Environment, 267, 67-85.

**Jones, K.C.; Grimmer, G.; Johnston, A.E., 1989.** Science of the Tototal Environment, 78, 117-130.

**Bucheli, T.D.; Blum, F.; Desaules, A.; Gustafsson, Ö., 2004.** Chemosphere, 56, 1061–1076.

**García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J.; 2006.** Environmental Science and Technology, 40, 759-763.

**Gschwend, P.M.; Hites, R.A., 1981.** Geochimica et Cosmochimica Acta, 45 (12), 2359–2367.

**Simcik, M.F.; Eisenreich, S.J.; Golden, K.A.; Liu, S.P.; Lipiatou, E.; Swackhamer, D.L.; Long, D.T., 1996.** Environmental Science and Technology, 30 (10), 3039–3046.

**Fernández, P.; Vilanova, R.M.; Martinez, C; Appleby, P.; Grimalt, J.O., 2000.** Environmental Science and Technology, 34 (10), 1906-1913.



**Tabla 6.** Niveles de PAHs totales encontrados en turberas de diferentes países ( $\mu\text{g/kg}$ ).

Área	Rango de concentraciones	Referencias
NO de Inglaterra	1250-25880	<i>Sanders y col., 1995</i>
SO de Suiza	125-2853	<i>Berset y col., 2001</i>
E de Canada	48-2790	<i>Dreyer y col., 2005</i>
NO Polonia	70-439	<i>Malawska y col., 2002</i>
NO de España	20-192	<i>Este trabajo</i>

Al estudiar la carga contaminante de la turbera de PVO a nivel individual, se comprueba que se producen cambios considerables en el perfil de los PAHs, en función de la profundidad (**Figura 7**).

Los PAHs de alto peso molecular (276 g/mol) sólo se encuentran en las turbas más superficiales, especialmente en las datadas a partir del 1738. El resto de los PAHs (F, P, B[a]A, Chr, 5-MChr, B[b]F, B[k]F y B[a]P) se detectaron en todos los estratos de la turbera, aún así la proporción de algunos de estos analitos (especialmente el F, P, B[b]F, B[k]F y B[a]P) con respecto al total, varía considerablemente de unas épocas a otras.

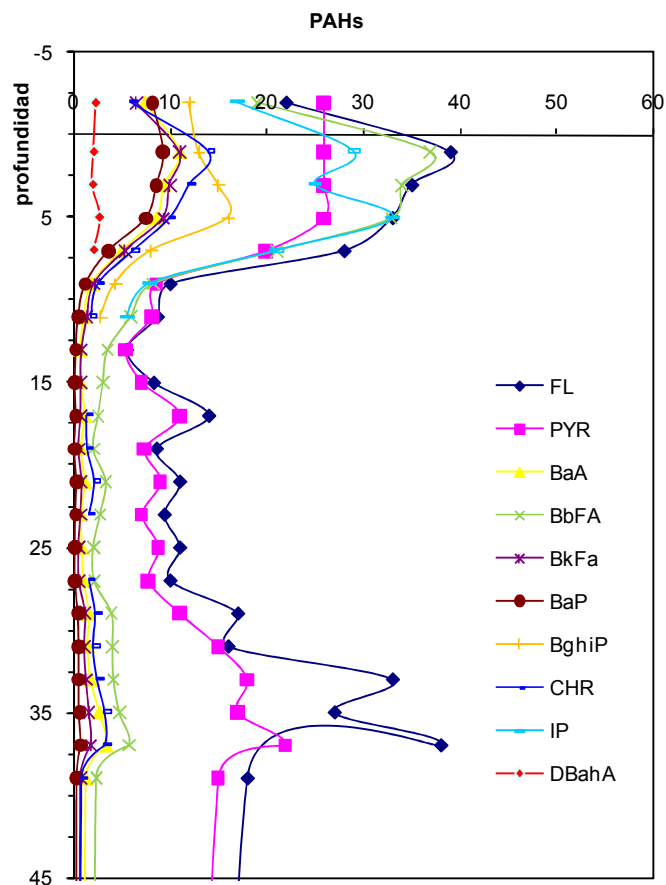
---

Sanders, G.; Jones, K. C.; Hamilton-Taylor, J.; Dorr, H., 1995. Environmental Pollution, 89, 17-25.

Berset, J. D.; Kuehne, P.; Shotyk, W., 2001. Science of the Total Environment, 267, 67-85.

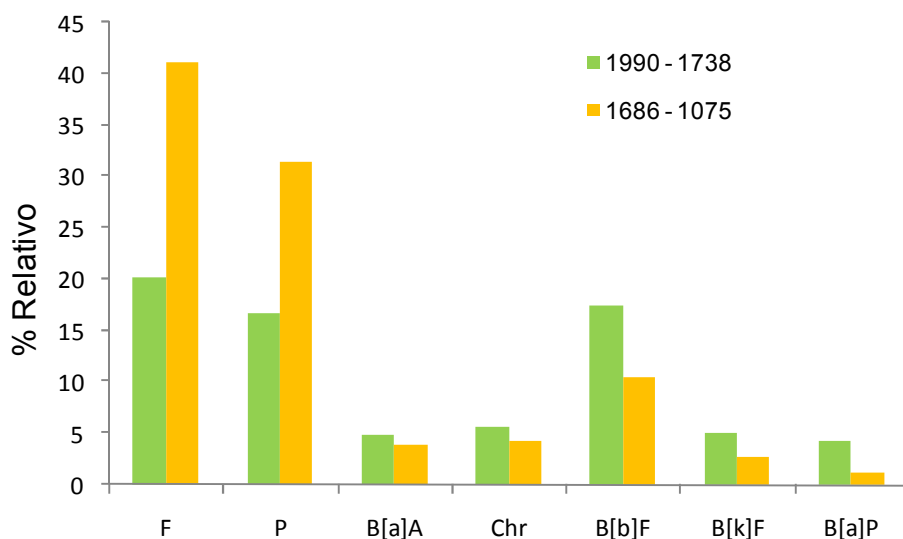
Dreyer, A.; Radke, M.; Turunen, J.; Blodau, C., 2005. Environmental Science and Technology, 39 (11), 3918-3924.

Malawska, M.; Bojakowska, I.; Wilkomirski, B., 2002. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 165, 686-691.



**Figura 7.** Distribución en profundidad de los PAHs de la turbera de Penido Vello.

En la **Figura 8** se muestra la media del porcentaje relativo de estos PAHs con respecto al total, durante los períodos 1686-1075 y 1738-1990.



**Figura 8.** Porcentajes relativos de cada uno de los PAHs con respecto al total durante los periodos 1738-1990 y 1686-1075.

Se observa que el F y el P son los compuestos más abundantes durante el periodo 1686-1075, representando el 43 y el 33 % del total, respectivamente. En cambio durante el periodo 1738-1990, los porcentajes del B[b]F, B[k]F y B[a]P se incrementan en detrimento de los del F y P. El diferente origen de los PAHs durante estas dos épocas, podrían explicar este comportamiento. Los PAHs de bajo peso molecular (202 g/mol) como el F y el P, predominarían en los humos procedentes de la combustión de madera u otro material vegetal. En cambio los PAHs de más alto peso molecular, denotarían combustión de combustibles fósiles y sus derivados. De acuerdo con la **Tabla 7**, estos últimos son también los PAHs más fácilmente bioacumulables.

**Tabla 7.** Peso molecular (g/mol), solubilidad (mol/L) y log P (coeficiente de partición octanol-agua) de los PAHs estudiados. Datos adquiridos de ACS SciFinder Scholar, 2006.

PAHs	Factor de Bioconcentración	Peso molecular	Solubilidad	Log P
F	5010	202	$6,3 \times 10^{-7}$	$5,2 \pm 0,20$
P	5010	202	$2,2 \times 10^{-7}$	$5,2 \pm 0,20$
B[a]A	18300	228	$6,4 \times 10^{-8}$	$5,9 \pm 0,20$
Chr	18300	228	$4,2 \times 10^{-8}$	$5,9 \pm 0,20$
5-MChr	40900	242	$4,0 \times 10^{-8}$	$6,4 \pm 0,20$
B[b]F	43200	252	$2,0 \times 10^{-8}$	$6,4 \pm 0,20$
B[k]F	43200	252	$1,3 \times 10^{-8}$	$6,4 \pm 0,20$
B[a]P	43200	252	$7,4 \times 10^{-9}$	$6,4 \pm 0,20$
DB[a,l]P	372000	302	$8,8 \times 10^{-10}$	$7,6 \pm 0,20$
DB[a,h]A	157000	278	$2,5 \times 10^{-9}$	$7,1 \pm 0,20$
B[ghi]P	102000	276	$5,9 \times 10^{-9}$	$6,9 \pm 0,20$
I[1,2,3-cd]	102000	276	$6,8 \times 10^{-9}$	$6,9 \pm 0,20$

Esta distribución de PAHs a lo largo de la turbera también podría tener otra explicación. Los PAHs de alto peso molecular tienden a viajar en el medio aéreo unidos a las partículas atmosféricas gruesas, propensas a la deposición seca. Esto hace que tengan menor transferencia de distancia y se depositen en zonas cercanas al foco de emisión. Los PAHs de bajo peso molecular se mantienen más tiempo en la atmósfera depositándose en lugares más alejados [Warneck, 1988]. Considerando los resultados de este trabajo, el perfil de contaminación encontrado en las épocas más antiguas, podría denotar que los PAHs se generaron en lugares lejanos a la turbera. Por el contrario el predominio de PAHs de alto peso molecular en las capas más superficiales, indicarían que el foco de emisión estaría más próximo.

## Capítulo II

---



## Análisis de alimentos vegetales expuestos a un incendio de una industria química

Las dos posibles fuentes de contaminación de los vegetales por PAHs, están representadas por la deposición atmosférica y por la migración de estos residuos desde los suelos contaminados, hacia el sistema radicular de la planta y posterior translocación a las hojas o frutos [**Barber y col., 2004**]. Hay autores que aseguran que esta segunda fuente es poco relevante, ya que los estudios revelan que no existe correlación entre los niveles de PAHs encontrados en los suelos y en las plantas cultivadas en los mismos. Este fenómeno se atribuye a la escasa disponibilidad de los PAHs por estar fuertemente adsorbidos a la materia orgánica de los suelos [**Kipopoulou y col, 1999; Barber y col., 2004; García-Falcón y col., 2004; Li y col., 2008**]. La deposición de estos residuos en la superficie de las plantas a partir del medio aéreo constituye, por tanto, la principal fuente contaminante. Hay diversos estudios que demuestran que el perfil de PAHs en la superficie de ciertas especies vegetales es similar al medio aéreo que las circunda, demostrando que la contaminación procede fundamentalmente de este compartimento [**Kipopoulou y col, 1999**]. Las actividades humanas cotidianas en las que se generan humos, ya sea por la pirólisis de combustibles fósiles u otro tipo de materia orgánica, liberan importantes cantidades de PAHs a la atmósfera. Aún así, hay ciertos episodios que pueden contribuir a incrementar puntualmente esta carga contaminante, como son aquellas catástrofes que van acompañadas de humos tóxicos. Los PAHs de bajo peso molecular suelen viajar por el aire en fase vapor, mientras que los PAHs de mayor peso molecular lo hacen adsorbidos a partículas atmosféricas. Los primeros pueden ser fácilmente adsorbidos en la superficie cerosa de frutas y vegetales, en cambio los PAHs ligados a partículas, se depositan por vía seca o húmeda. [**Kluska, 2003; Kipopoulou y col, 1999**]. El grado de deposición de los PAHs sobre la superficie de los vegetales, dependerá de aspectos como área de superficie, orientación de las hojas, grado de vello, etc [**Barber y col., 2004**].

El aire, el agua y los alimentos, constituyen las principales vías de exposición del hombre a los PAHs, contribuyendo estos últimos en un 99% [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**]. En la dieta española, las

---

Barber, J. L.; Thomas, G. O.; Kerstiens, G.; Jones, K. C., 2004. Environmental Pollution, 128, 99-138.

Kipopoulou, A.M.; Manoli, E.; Samara, C., 1999. Environmental Pollution, 106, 369-380.

García-Falcón, M.S.; Pérez-Lamela, C.; Simal-Gándara, J., 2004. Analytica Chimica Acta, 508 (2), 177-183.

Li, Y.T.; Li, F.B.; Chen, J.J.; Yang, G.Y.; Wan, H.F.; Zhang, T.b.; Zeng, X.D.; Liu, J.M., 2008. Environmental Monitoring and Assessment, 139 (1-3), 61-76.

Kluska, M., 2003. Polish Journal of Environmental Studies, 12(3), 309-313.

European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002. Opinion of the science committee on food on the risk to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

frutas y hortalizas contribuyen en un 6,4 % a la ingesta total de PAHs y en un 11% a la ingesta de B[a]P [Ibáñez y col., 2005]. Aunque hay otros autores, como **Dennis y col., 1983**, que recogen contribuciones más elevadas de PAHs totales, para este grupo de alimentos (20%).

Existen diversos estudios enfocados a estudiar la generación de PAHs durante procesos de combustión [Voutsas y Samara, 1998; Nadal y col., 2004; Wang y col., 2007]. También se recopilaban varios artículos en los que se trata de relacionar los niveles de estos contaminantes en el aire de zonas muy industrializadas y su acumulación en las plantas [Larsson y Salhberg, 1982; Kipopoulou y col., 1999; Wennrich y col., 2001] pero no se ha encontrado ningún trabajo en el que se evalúe el impacto de incendios regionales, como fuentes de contaminación de vegetales por PAHs.

En septiembre de 2006 se incendió una factoría de productos químicos en Caldas de Reis (Pontevedra). Con el fin de evaluar el impacto del suceso sobre la zona, se ha determinado el nivel de PAHs en diversos productos hortofrutícolas, recogidos en el área de influencia del incendio.

## 1. MUESTREO

Se monitorizó el triángulo formado por Caldas de Reis-Vilanova de Arousa-Cambados de 62Km<sup>2</sup> (**Figura 1**). El área de muestreo se eligió en base a las siguientes razones: (i) localización en la dirección de los vientos dominantes de final de verano bajo condiciones anticiclónicas, y (ii) ser una de las áreas de mayor actividad agrícola de la zona.

Una semana después del incendio, la empresa encargada de gestionar el muestreo, facilitó muestras de cinco tipos productos vegetales, por triplicado: maíz, uvas, pimientos tipo padrón, tomates y repollos. En el caso del maíz y del repollo, se analizaron las hojas con mayor superficie y que se encontraban, por su orientación más expuestas a la contaminación. Los productos se mantuvieron entre 0-4 ° C desde la recogida hasta que fueron analizadas por duplicado, siguiendo el protocolo recogido en la **Figura 2**.

---

Ibáñez, R.; Agudo, A.; Berenguer, A.; Jakszyn, P.; Tormo, M.J.; Sánchez, M.J.; Quirós, J.R.; Pera, G.; Navarro, C.; Martínez, C.; Larrañaga, N.; Dorronsoro, M.; Chirlaque, M.D.; Barricarte, A.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; González, C.A., 2005. *Journal of Food Protection*, 68, 2190-2195.

Dennis, M.J.; Massey, R.C.; McWeeny, D.J.; Knowles, M.E.; Watson, D., 1983. *Food Additives and Contaminants*, 21, 569-574.

Voutsas, D.; Samara, C., 1998. *Science of the Total Environment*, 218, 203-216.

Nadal, M.; Schuhmacher, M.; Domingo, J. L., 2004. *Environmental Pollution*, 132, 1-11.

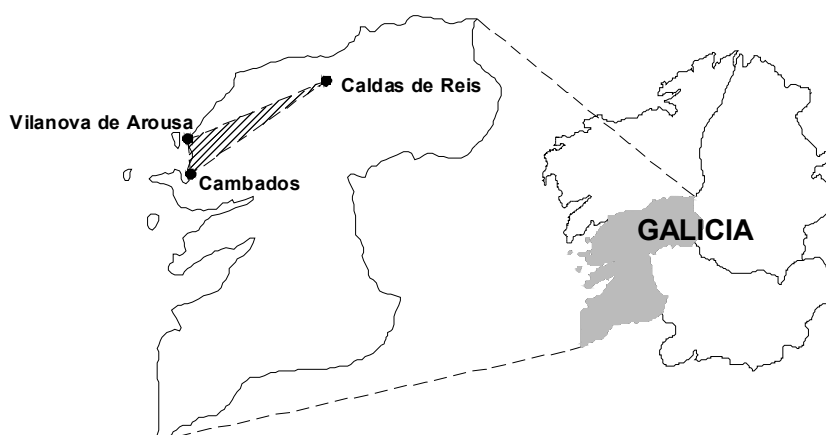
Wang, Z., Li, K., Lambert, P., Yang, C., 2007. *Journal of Chromatography A*, 1139, 14-26.

Larsson, B.K.; Salhberg, G., 1982. Polycyclic aromatic hydrocarbons in lettuce. Influence of a highway and an aluminium smelter. In: PAH: Physical and biological chemistry. Eds. Cooke, M.; Denis, A.J.; G.L., Battelle press, Columbus, Ohio.

Kipopoulou, A.M.; Manoli, E.; Samara, C., 1999. *Environmental Pollution*, 106, 369-380.

Wennrich, L.; Popp, P.; Zeibig, M., 2001. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 82 (10), 677-690.





**Figura 1.** Área de muestreo (Caldas de Reis-Vilanova de Arousa-Cambados) (Caldas de Reis situada a 42° 36' 11' N' 8° 38' 26" O).

## 2. DETERMINACIÓN DE PAHs

En este trabajo se determinaron 11 PAHs (B[a]A, Chr, 5-MChr, B[*j*]F, B[b]F, B[k]FA, B[a]P, DB[a,h]A, DB[a,l]P, B[*ghi*]P, I[1,2,3-cd]P), todos ellos reconocidos por la Unión Europea como posibles cancerígenos.

Para evaluar el grado de deposición de los PAHs procedentes de la nube tóxica sobre la superficie del vegetal, se ha realizado un lavado superficial de las muestras con n-hexano. El volumen de disolvente de extracción empleado, dependió del tamaño de las muestras. En este caso, y a diferencia de las turbas, se seleccionó el n-hexano como extractante, ya que los vegetales no presentan materia orgánica adsorbente (ácidos húmicos o fúlvicos), siendo suficiente la capacidad de este disolvente para extraer selectivamente todos los PAHs. Además, este protocolo analítico ya fue empleado satisfactoriamente en trabajos anteriores realizados por el grupo de investigación, para evaluar la carga contaminante de diferentes alimentos [García-Falcón y col, 1996; García-Falcón y Simal-Gándara, 2005; García-Falcón y col, 2005].

Se ha comprobado, mediante un lavado adicional de cada una de las muestras seleccionadas, que el método de extracción llevado a cabo para la determinación de PAHs en este tipo de muestras era cuantitativo. Después del

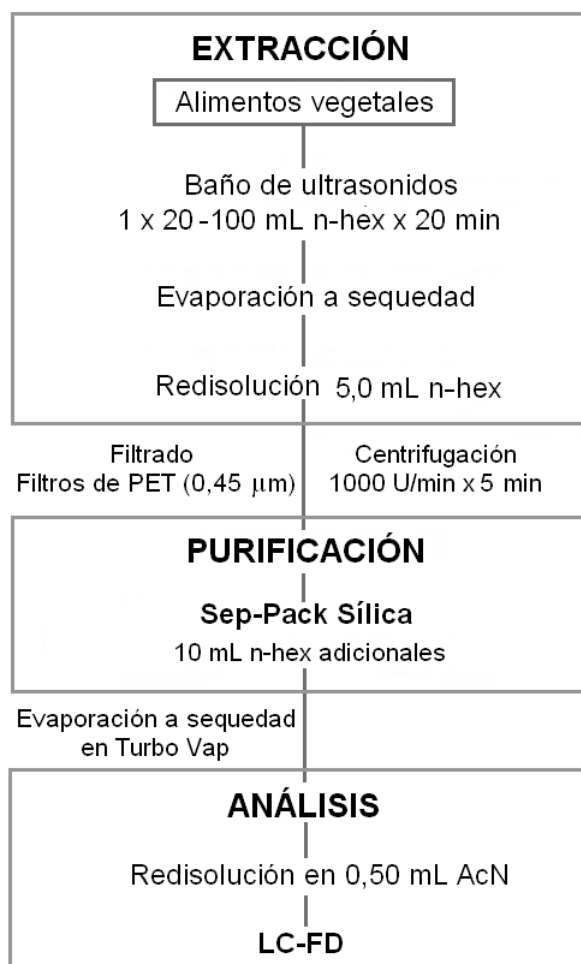
---

García Falcón, M.S.; López de Alda Villaizán, M.J.; González Amigo, S.; Simal Lozano, J.; Lage Yusty, M. A., 1996. *Journal of Chromatography*, 753, 207-215.

García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J., 2005. *Food Additives and Contaminants*, 22(1), 1-8.

García-Falcón, M.S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J., 2005. *Food Chemistry*, 90, 643-647.

primer lavado, en la muestra tan sólo quedan niveles residuales de esos contaminantes, inferiores al 8,0% para todos los PAHs. Para evaluar la precisión (% RSD) del método, se analizaron por triplicado dos muestras de vegetales, (repollo y tomate). Los %RSD obtenidos en la primera muestra oscilaron entre el 6,3 y el 7,4 %, en el caso de la muestra de tomate, fueron <5,5%.



**Figura 2.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de alimentos vegetales.

Los límites de detección y cuantificación se han calculado, al igual que en el Capítulo anterior siguiendo los principios de la ACS [ACS, 1980] (Tabla 1).

**Tabla 1.** Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en alimentos de origen vegetal ( $\mu\text{g/L}$ ,  $n=6$ ).

PAHs	LD	LQ
B[a]A	0,080	0,20
Chr	0,50	1,5
5-MChr	0,25	0,70
B[ <i>l</i> ]F	1,3	3,5
B[b]F	0,20	0,50
B[k]F	0,020	0,050
B[a]P	0,050	0,15
DB[a, <i>l</i> ]P	0,20	1,0
DB[a, <i>h</i> ]A	0,33	0,50
B[ <i>ghi</i> ]P	1,4	3,5
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	0,70	2,0

### 3. NIVELES DE PAHS EN PRODUCTOS VEGETALES TRAS EL INCENDIO

Tras el incendio de la planta de productos químicos se hizo un estudio de la distribución de los niveles de PAHs, sobre diversos productos hortofrutícolas de la zona (maíz, uva, pimientos tipo padrón, tomate y repollo), con el fin de evaluar la magnitud del incidente. En la **Tabla 2** se muestran los niveles medios de PAHs ( $\text{ng/kg}$ ) encontrados para cada tipo de alimento vegetal. Los niveles totales, que oscilaron entre 88  $\text{ng/kg}$  (tomates) y 4240  $\text{ng/kg}$  (repollo), variaron mucho incluso en las muestras de la misma especie vegetal (**Tabla 2**). En todos los productos se encontraron Chr, B[b]F, B[a]A, B[k]F y B[a]P a niveles cuantificables. En la **Figura 3**, se puede observar que el Chr y el B[b]F son, en general, los dos PAHs mayoritarios en todas las muestras analizadas. La presencia de mezclas de distintos PAHs en los organismos, dificulta la evaluación de su toxicidad neta. Con el fin de solventar este problema, **Nisbet y LaGoy, 1992** proponen expresar los resultados en términos del factor internacional de toxicidad equivalente, o FTE. Este factor relaciona la toxicidad de cada uno de los PAHs con la del más tóxico, el B[a]P, al que se le asigna arbitrariamente el valor 1 de FTE. Por ello, en la **Tabla 2** se han incluido los factores de toxicidad equivalente para cada una de las especies vegetales analizadas. Se puede observar que los tomates, aunque tienen menor carga de PAHs que los pimientos, presentan una mayor toxicidad, con un valor medio de FTE de 17.

**Tabla 2.** Concentración de PAHs encontrados en vegetales (ng/Kg  $\pm$  s.d., pg/cm<sup>2</sup> n=3), junto con los FTE.

PAHs	FTE	Hojas de repollo (14 cm <sup>2</sup> /g)	Hojas de maíz (36 cm <sup>2</sup> /g)	Uvas (19 cm <sup>2</sup> /g)	Pimientos de Padrón (3,4 cm <sup>2</sup> /g)	Tomates (0,55cm <sup>2</sup> /g)
B[a]A	0,10	900 $\pm$ 827	450 $\pm$ 350	72 $\pm$ 57	27 $\pm$ 8,0	16 $\pm$ 12
Chr	0,010	1320 $\pm$ 1055	700 $\pm$ 600	47 $\pm$ 35	70 $\pm$ 28	29 $\pm$ 9,0
5-MChr	0,010	nc	nc	nc	nc	nc
B[j]F	0,10	nd	nd	nd	nd	nd
B[b]F	0,10	920 $\pm$ 723	660 $\pm$ 410	173 $\pm$ 111	11 $\pm$ 10	21 $\pm$ 9,0
B[k]F	0,10	325 $\pm$ 215	175 $\pm$ 150	20 $\pm$ 16	7,0 $\pm$ 3,0	10 $\pm$ 8,0
B[a]P	1,0	775 $\pm$ 725	388 $\pm$ 260	35 $\pm$ 10	6,0 $\pm$ 2,0	12 $\pm$ 6,0
DB[a,l]P	5,0	nd	nd	nd	nd	nd
DB[a,h]A	5,0	nd	nd	nd	nd	nd
B[ghi]P	0,010	nd	nd	nd	nd	nd
I[1,2,3-cd]P	0,10	nd	nd	nd	nd	nd
$\Sigma$ PAHs totales		4240	2373	347	121	88
FTE		1003	524	62	11	17
$\Sigma$ PAHs (pg/cm <sup>2</sup> )		305	67	176	36	160
FTE (pg/cm <sup>2</sup> )		72	15	32	3,3	31

En la UE no se encuentran legislados los niveles máximos de PAHs en alimentos vegetales. Sin embargo, sí existen límites de B[a]P para algunos alimentos, como son: 1,0 µg/Kg para los preparados infantiles, 2,0 µg/Kg para los aceites vegetales o 10 µg/Kg para los moluscos bivalvos [**Reglamento comunitario 1881/2006**]. Dichos niveles no se han alcanzado en ninguna de las muestras analizadas, siendo la concentración de B[a]P más elevada, la encontrada para las muestras de repollo (775 ng/Kg) (**Tabla 2**). Se podría decir que las concentraciones de PAHs detectadas después del incendio no son alarmantes, quizás porque los vientos predominantes en el área de O Salnés los días posteriores al incidente, evitaron la deposición de estos residuos sobre los vegetales.

Los niveles de PAHs encontrados en este estudio son muy inferiores a los medidos por otros autores en productos hortofrutícolas cultivados próximos a zonas industrializadas o a carreteras muy transitadas. **Wennrich y col., 2001**, analizaron futas y vegetales de una de las regiones industriales más contaminadas de Alemania, encontrando 119 µg/Kg en perejil, 15 µg/Kg en manzanas, 4,7 µg/Kg en tomates y 4,0 µg/Kg en lechuga. **Li y col., 2008**, estudiaron la carga de PAHs en diferentes frutas y hortalizas, producidas en una zona agrícola rodeada de varias metrópolis. Los niveles totales medios de PAHs, variaron entre los 393 µg/Kg para los vegetales de hoja y los 226 µg/Kg para los frutos. En Tianjin (China), una ciudad con una elevada contaminación medioambiental, se determinaron niveles de hasta 216 µg/Kg de PAHs totales en hojas de arroz, [**Tao y col., 2006**]. **Voutsas y Samara, 1998**, analizaron productos vegetales (repollo, zanahoria, lechuga, endivia y puerro) cultivados en el área industrial de Tesalonika (Grecia), verificando que las concentraciones de PAHs eran muy bajas, incluso inferiores a las obtenidas en este trabajo, aunque estos autores determinaron los PAHs una vez lavadas y/o peladas las hortalizas.

En la **Tabla 2** también se expresa el contenido de PAHs por unidad de superficie (pg/cm<sup>2</sup>), oscilando entre 36 y 305 pg/cm<sup>2</sup>. Estos resultados no son tan variables como por unidad de peso, lo que sería indicativo de que la fuente de contaminación para todos estos vegetales es el aire.

Como se puede comprobar en la **Figura 3**, la carga total de PAHs (µg/kg) disminuyó progresivamente del repollo al tomate, pasando por el maíz, la uva y el pimiento. Estos contaminantes entran en los tejidos de las plantas a través de la fase gaseosa o por la deposición de aquellas partículas

---

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

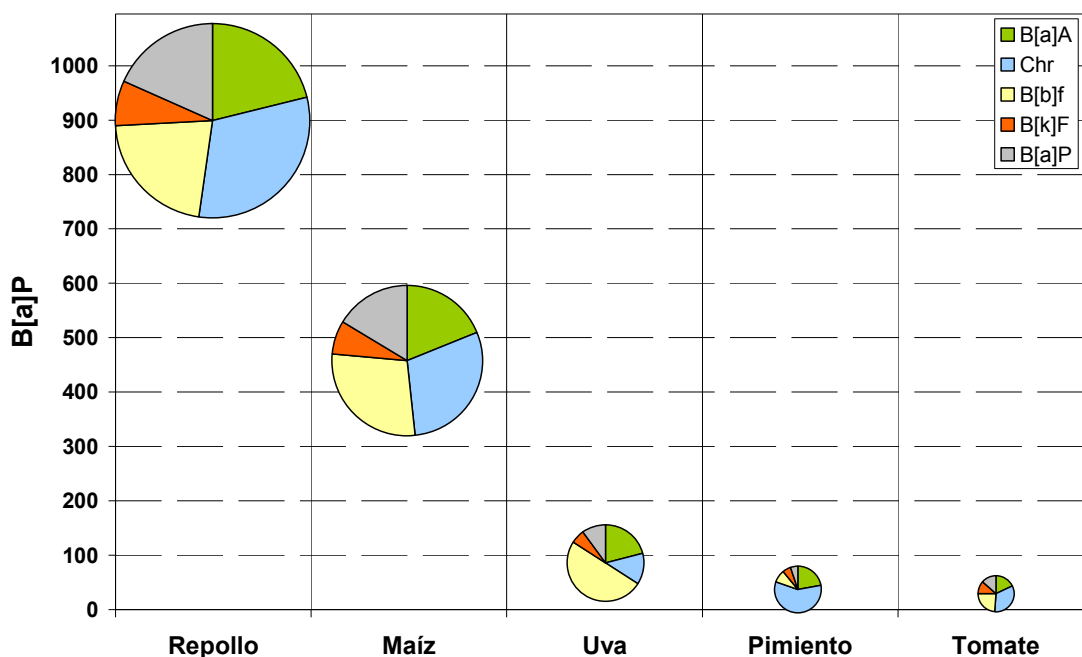
**Wennrich, L.; Popp, P.; Zeibig, M., 2001.** Journal of Environmental Analytical Chemistry, 82 (10), 677-690.

**Li, Y.T.; Li, F.B.; Chen, J.J.; Yang, G.Y.; Wan, H.F.; Zhang, T.b.; Zeng, X.D.; Liu, J.M., 2008.** Environmental Monitoring and Assessment, 139 (1-3), 61-76.

**Tao, S.; Jiao, X. C.; Chen, S. H.; Liu, W. X.; Coveney, R. M., Jr; Zhu, L.Z.; Luo, Y.M., 2006.** Environmental Pollution, 140, 406-415.

**Voutsas, D.; Samara, C., 1998.** Science of the Total Environment, 218, 203-216.

atmosféricas, que llevan PAHs adsorbidos [Barber y col., 2004]. Por lo tanto, cuanto mayor sea el área de exposición de la planta a la atmósfera, mayor será el nivel de deposición de PAHs sobre ella [Böhme y col., 1999; Kipopoulou y col., 1999; Wennrich y col., 2001; Barber y col., 2004]. Kipopoulou y col., 1999, determinaron el contenido de PAHs en diferentes especies vegetales cultivadas cerca de un área industrial al norte de Grecia. Estos autores encontraron las mayores cargas de estos residuos en las hortalizas de hoja (lechuga y endivia) y atribuyeron estos resultados a su mayor superficie de exposición a la atmósfera. Igualmente, Böhme y col., 1999, encontraron grandes variaciones en la acumulación de PAHs sobre 10 especies vegetales de diferentes superficies.



**Figura 3.** Promedio de concentraciones ((ng/Kg, n=3) en los diferentes vegetales (eje x); las áreas de los círculos son proporcionales al total de PAHs en cada uno de ellos. En el eje y se representa el nivel de B[a]P (ng/Kg).

La menor carga de PAHs observada en las uvas, pimientos y tomates, con respecto al maíz y al repollo, también podría deberse al efecto de dilución debida al mayor contenido de humedad de las primeras.

En ninguno de los productos hortofrutícolas analizados se encontraron PAHs con pesos moleculares superiores a 252 g/mol, como el B[ghi]P, I[1,2,3-

Barber, J. L.; Thomas, G. O.; Kerstiens, G.; Jones, K. C., 2004. Environmental Pollution, 128, 99-138.

Böhme, F.; Welsch-Pausch, R.; Mclachlan, M.S., 1999. Environmental Science and Technology, 33, 1805-1813.

Kipopoulou, A.M.; Manoli, E.; Samara, C., 1999. Environmental Pollution, 106, 369-380.

Wennrich, L.; Popp, P.; Zeibig, M., 2001. Journal of Environmental Analytical Chemistry, 82 (10), 677-690.

Barber, J. L.; Thomas, G. O.; Kerstiens, G.; Jones, K. C., 2004. Environmental Pollution, 128, 99-138.

cd]P, DB[a,l]P y DB[a,h]A. **Edwards, 1983**, sugieren que los PAHs de menor peso molecular, los cuales son los predominantes en la atmósfera, pueden penetrar más fácilmente a través de la superficie cuticular de las hojas, mientras que los de mayor peso molecular, principalmente relacionados con las partículas atmosféricas, sólo se depositan superficialmente sobre las hojas de las plantas, por lo que son más fácilmente arrastrados por la lluvia. En el periodo de tiempo transcurrido entre el incendio y la recogida de las muestras, se registraron precipitaciones en la zona de O Salnés. Otra posible explicación para el bajo contenido de compuestos de alto peso molecular, es que estos PAHs, al viajar adsorbidos a las partículas gruesas, son propensos a la deposición seca, lo que hace que tengan menor transferencia de distancia y se depositen en zonas muy cercanas al foco de emisión, no alcanzando las áreas de cultivo donde se recogieron las muestras. Por el contrario, las partículas finas quedan suspendidas en la atmósfera durante mucho tiempo. **Warneck, 1988**, comprobó que partículas 0,10-1,0  $\mu\text{m}$  pueden permanecer en el aire hasta 10 días. Al igual que en este trabajo, **Voutsas y Samara, 1998**, encontraron como PAHs mayoritarios los de menor peso molecular, en hortalizas cultivadas en una zona industrial en Grecia. **Liu y Korenaga, 2001**, observaron que los coeficientes de relación entre los PAHs de menor (152 – 202 g) y mayor peso molecular (228 - 252 g) eran aproximadamente 70:30, en la cáscara del arroz y las hojas, al medir 10 PAHs en arroz de Tokushima, Japón.

En base a que las concentraciones de PAHs encontradas en los diferentes productos vegetales seleccionados no son alarmantes, (4,2  $\mu\text{g/Kg}$  máximos, (**Tabla 2**) se podría considerar que la intensiva área hortofrutícula de O Salnés no se vio afectada por el incendio y por ello, no ha sido necesario advertir de los posibles efectos adversos por su ingesta.

---

**Edwards, N.T., 1983.** Journal of Environmental Quality, 12, 427-441.

**Warneck, P., 1988.** Chemistry of the Natural Atmosphere, Academic Press, New York.

**Voutsas, D.; Samara, C., 1998.** Science of the Total Environment, 218, 203-216.

**Liu, X. X.; Korenaga, T., 2001.** Journal of Health Science, 47, 446-451.





## Capítulo III

---



## Determinación de PAHs nativos y sus metabolitos en fórmulas lácteas infantiles

Los alimentos, el agua y el aire son las principales vías de exposición de los mamíferos a los PAHs [**Ciganek y col., 2002**]. Una vez absorbidos por el organismo, los PAHs se distribuyen por vía sanguínea a una gran variedad de tejidos, con una particular implicación a localizarse en el tejido adiposo, debido a su carácter lipofílico. De todas formas, esta tendencia no es muy manifiesta, debido a su rápido metabolismo a nivel de los microsomas. El principal objetivo de la metabolización se centra en aumentar la polaridad de estos compuestos, para convertirlos en sustancias más hidrosolubles y más fáciles de excretar. Aunque este mecanismo produce principalmente una desintoxicación, hay algunos PAHs que se convierten en especies más reactivas, con propiedades mutagénicas y/o carcinogénicas [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**].

Desde el punto de vista metabólico, el P y el B[a]P son dos de los PAHs mejor caracterizados en mamíferos, transformándose en distintos metabolitos de fase I, entre los que se incluyen el 3-Hidroxi-Benzo[a]Pireno (3-OH-B[a]P) y el 1-Hidroxi-Pireno (1-OH-P). Estos hidroxi PAHs pueden transformarse a su vez, en metabolitos de fase II por conjugación con grupos glucurónidos y sulfatos. Aunque las heces y la orina son las principales vías de excreción de los PAHs y sus metabolitos, también pueden producirse transferencias parciales a la leche [**Grova y col., 2002 y 2006; Lutz y col., 2006; Lapole y col., 2007**]. **Grova y col., 2006** y **Lapole y col., 2007**, verificaron que la exposición a PAHs por vía oral, provocaba en cabras un significativo incremento de metabolitos en la leche, manteniéndose en cambio constantes, los niveles de PAHs nativos. **Lutz y col., 2006**, obtuvieron resultados semejantes cuando estudiaron la cinética de transferencia de PAHs, desde suelos contaminados a la leche en una cabaña de vacas.

La determinación de metabolitos no se incluye habitualmente en los programas de control, de contaminación de leche por PAHs [**Aguinaga y col,**

---

**Ciganek, M.; Ulrich, R.; Neca, J.; Raszyk, J., 2002.** Veterinarni Medicina, 47(5), 137-142.

**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002.** Opinion of the science committee on food on the risk to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

**Grova, N.; Feidt, C.; Laurent, C.; Rychen, G., 2002.** International Dairy Journal, 12, 1025-1031.

**Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C., 2006.** Agronomy for Sustainable Development, 26, 195-199.

**Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

**Lapole, D.; Rychen, G.; Grova, N.; Monteau, F.; Le Bizec B.; Feidt, C., 2007.** Journal of Dairy Science, 90, 2624-2629.

**2007; Kishikava y col., 2003; Zanieri y col., 2007]**. En los últimos años varios trabajos recogen la necesidad de determinar en algunos alimentos, como la leche o ciertos pescados, no sólo los PAHs nativos sino también sus metabolitos mayoritarios [**Bulder y col., 2006; Grova y col., 2000 y 2006; Lutz y col., 2006**].

La presencia de PAHs y sus metabolitos en formulas lácteas infantiles, resulta un importante riesgo para la salud de los niños, ya que son más sensibles que los adultos a este tipo de contaminantes. En la actual reglamentación comunitaria, el contenido de B[a]P en los alimentos infantiles se limita a 1,0 µg/Kg, no haciendo alusión en ningún caso a los metabolitos de estos residuos [**Reglamento comunitario 1881/2006**].

En este Capítulo se estudiará el contenido de 11 PAHs cancerígenos, en diferentes muestras de leche infantil en polvo de venta y consumo en nuestro país. Se chequeará además la presencia de dos hidroximetabolitos de PAHs (1-OH-P y el 3-OH-B[a]P) y sus conjugados. EL 1-OH-P es un importante marcador de contaminación medioambiental, mientras que el 3-OH-B[a]P tiene un elevado potencial como cancerígeno y disruptor endocrino. Para determinar estos últimos compuestos, fue necesario desarrollar previamente un método analítico apropiado basado en HPLC-FD.

## 1. MUESTREO

Para este estudio se adquirieron 19 muestras de leche infantil en polvo de venta y consumo en nuestro país. Las muestras incluyen 6 leches de inicio (nº 1, 3, 5, 6, 11 y 13), 8 de continuación (nº 2, 4, 7, 8, 12, 15, 16, 19) y 4 destinadas a niños con alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, alergias alimentarias y trastornos gastrointestinales (9, 10, 14, 17, 18). En la Tabla 1 del Anexo se recogen algunas de las características de estas

---

**Aguinaga, N.; Campilloa, N.; Viñas, P.; Hernández-Córdoba, M., 2007.** *Analytica Chimica Acta*, 596, (2), 285-290.

**Kishikava, N.; Wada, M.; Kuroda, N.; Akiyama, S.; Nakashima, K., 2003.** *Journal of Chromatography B*, 789, 257-264.

**Zanieri, L.; Galvan, P.; Checchini, L.; Cincinelli, A.; Lepri, L.; Donzelli, G.P.; Del Bubba, M., 2007.** *Chemosphere*, 67, 1265-1274.

**Bulder, A.S.; Hoogenboom, L.A.P.; Kan, C.A.; Raamsdonk, L.W.D.; Van Traag, W.A.; Bouwmeester, H., 2006.** Initial risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in feed (materials). In [http://library.wur.nl/file/wurpubs/LUWPUBRD\\_00352428\\_A502\\_001.pdf](http://library.wur.nl/file/wurpubs/LUWPUBRD_00352428_A502_001.pdf)

**Grova, N.; Laurent, C.; Feidt, C.; Rycken, G.; Laurent, F.; Lichtfouse, E., 2000.** *European Journal of Mass Spectrometry*, 6 (5), 457-460.

**Grova, N.; Rycken, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C., 2006.** *Agronomy for Sustainable Development*, 26, 195-199.

**Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rycken, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 263-268.

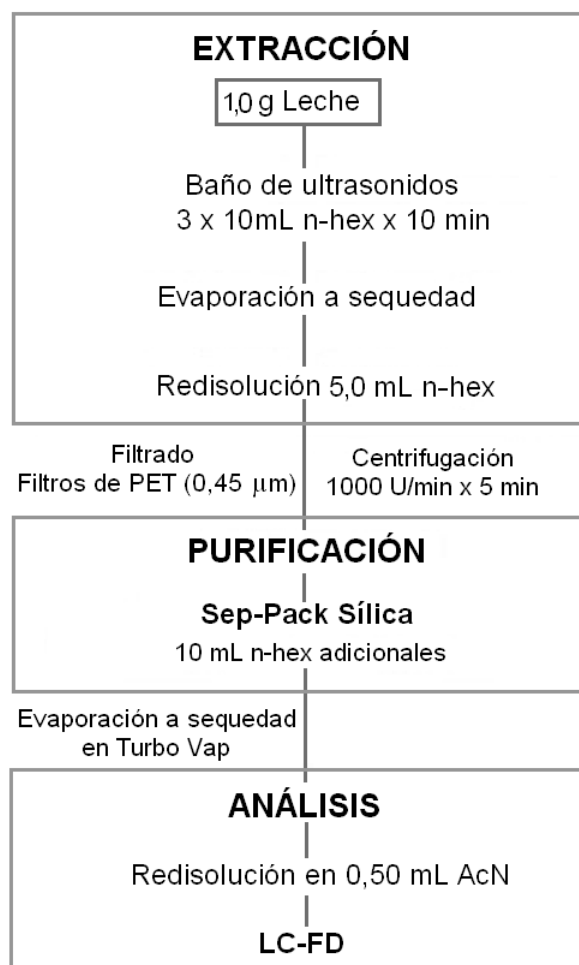
**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

muestras, incluyendo los principales ingredientes que poseen. De acuerdo con el **Real Decreto 72/1998** de 23 de enero, las leches de inicio son aquellos productos alimenticios destinados a lactantes desde el nacimiento hasta los primeros cuatro o seis meses de vida y las de continuación, las empleadas a partir de los cuatro meses de edad.

Teniendo en cuenta que la leche en polvo tiene un contenido de humedad muy reducido y un tamaño de partícula muy fino y homogéneo, las muestras se procesaron directamente, sin ningún tratamiento previo de deshidratación o triturado. Cada muestra se analizó por duplicado para determinar los PAHs y sus metabolitos, siguiendo los protocolos analíticos descritos en los siguientes apartados.

## **2. DETERMINACIÓN DE PAHs**

Se determinaron 11 PAHs (B[a]A, Chr, 5-MChr, B[*j*]F, B[b]F, B[k]FA, B[a]P, DB[a,*i*]P, DB[a,*h*]A, B[*ghi*]P, I[1,2,3-cd]P), todos ellos reconocidos por la Unión Europea como posibles cancerígenos en alimentos. El protocolo seguido (**Figura 1**) es muy similar al empleado para el análisis de alimentos vegetales (Capítulo II), con la salvedad de que en este caso, en lugar de hacer un lavado superficial de la muestra, se realizó una extracción convencional.



**Figura 1.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de leche infantil.

Para evaluar la recuperación (%R) y la precisión (% RSD) del método, se analizó por triplicado una muestra de leche infantil sobrecargada con PAHs a los niveles recogidos en la **Tabla 1**. Previamente se comprobó que esta muestra no contenía PAHs a niveles cuantificables. Antes de ser procesadas siguiendo el protocolo analítico descrito anteriormente, las muestras se mantuvieron durante 24 horas para facilitar el correcto reparto de los analitos en la matriz. Los %R obtenidos oscilan entre el 100 y el 107%, siendo el % RSD inferior al 9,0% en todos los casos (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** %R% y %RSD obtenidos al analizar por triplicado una de las muestras de leche infantil (nº1) sobrecargada con PAHs (µg/Kg).

PAHs	Sobrecarga	%R	%RSD
B[a]A	0,42	105	6,8
Chr	2,5	103	5,1
5-MChr	2,5	102	6,0
B[j]F	7,0	102	4,7
B[b]F	0,75	107	7,9
B[k]F	0,10	105	7,0
B[a]P	0,26	101	8,8
DB[a,]P	3,0	101	6,0
DB[a,h]A	0,90	100	6,2
B[ghi]P	7,0	102	6,5
I[1,2,3-cd]P	3,6	100	5,6

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se han calculado de igual manera que en los Capítulos anteriores [ACS, 1980] (Tabla 2). El LC alcanzado para el B[a]P (0,15 µg/Kg), permite determinar este analito a concentraciones muy inferiores a las requeridas por la legislación (1,0 µg/Kg).

**Tabla2.** Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en muestras de leche (µg/Kg, n=6).

PAHs	LD	LC
B[a]A	0,040	0,10
Chr	0,25	0,75
5-MChr	0,12	0,35
B[j]F	0,65	1,7
B[b]F	0,10	0,25
B[k]F	0,010	0,025
B[a]P	0,025	0,075
DB[a,]P	0,16	0,50
DB[a,h]A	0,10	0,25
B[ghi]P	0,70	1,7
I[1,2,3-cd]P	0,35	1,0

American Chemical Society (ACS), 1980. Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry. Guidelines for data acquisition and data evaluation in environmental chemistry. Analytical Chemistry. 522242-522249.

### 3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE PAHs

Se pusieron a punto las distintas etapas del protocolo analítico para la determinación del 1-OH-P y el 3-OH-B[a]P, así como sus formas conjugadas.

#### 3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS Y DE DETECCIÓN

Muchas han sido las técnicas analíticas empleadas hasta el momento, para la determinación de metabolitos de PAHs en diferentes tipos de muestras biológicas (sangre, orina, heces y bilis), medioambientales (aguas residuales, lodos y sedimentos) y alimentarias (leche y pescado). La mayor parte de estos métodos se basan en la separación mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia [**Wang y col., 2005; Marczynski y col., 2005; Van Schooten y col., 1997; Richardson y col., 2004; Lee y col., 2002; Simon y col., 2000**] o espectroscopía de masas (MS) [**Van de Wiele, y col., 2005**]. También hay otros protocolos que incluyen la cromatografía gaseosa con detección mediante MS [**Smith y col., 2002; Mazéas y Budzinski., 2005; Lutz y col., 2006; Huang y col., 2006**] o la espectrofluorimetría [**Roth y col., 2001**].

De todas las técnicas anteriores, en este trabajo se seleccionó la cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FD). Las condiciones cromatográficas empleadas (fase móvil, gradiente, temperatura de la columna y flujo) fueron puestas a punto con la intención de determinar simultáneamente en el mismo cromatograma, el 1-OH-P y el 3-OH-B[a]P (Tablas 7 y 8 de la Parte Experimental). Como fase móvil se utilizó una

---

**Wang, Y.; Zhang, W.; Dong, Y.; Fan, R.; Sheng, G.; Fu, J., 2005.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 804-809.

**Marczynski, B.; Preuss, R.; Mensing, T.; Angerer, J.; Seidel, A.; El Mourabit, A.; Wilhelm, M.; Brüning, T., 2005.** International Archives of Occupational and Environmental Health, 78, 97-108.

**Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

**Richardson, D.M.; Gubbins, M.J.; Davies, I.M.; Moffat, C.F.; Pollard, P.M., 2004.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 17, 79-85.

**Lee, W.; Shin, H.S.; Hong, J.E.; Pyo, H.; Kim, Y., 2002.** The Bulletin of the Korean Chemical Society, 24(5), 559-565.

**Simon, P.; Lafontaine, M.; Delsaut, P.; Morele, Y.; Nicot, T., 2000.** Journal of Chromatography B, 748, 337-348.

**Van de Wiele, T.; Vanhaecke, L.; Boeckaert, C.; Peru, K.; Headley, J.; Verstraete, W.; Siciliano, S., 2005.** Environmental Health Perspectives., 113, 6-10.

**Smith, C.J.; Huang, W.; Walcott, C.J.; Turner, W.; Grainger, J.; Patterson Jr, D.G., 2001.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372, 216-220.

**Mazéas, O. y Budzinski, H., 2005.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 985-990.

**Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rycken, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

**Huang, W.; Caudill, S.P.; Grainger, J.; Needham, L.L.; Patterson Jr, D.G., 2006.** Toxicology Letters, 163, 10-19.

**Roth, M.J.; Qiau, Y.L.; Rothman, N.; Tangrea, J.A.; Dawsey, S.M.; Wang, G.Q.; Cho, S.H.; Kang, D.; Taylor, P.R.; Strickland, P.T., 2001.** Biomarkers, 5, 381-386.



mezcla de acetonitrilo/agua, por haber sido empleada satisfactoriamente por otros autores para la determinación de metabolitos de PAHs [**Richardson y col., 2004**]. En una gran parte de la bibliografía manejada, se sustituye el acetonitrilo por metanol, obteniéndose igualmente resultados satisfactorios [**Whiton y col., 1995; Van Schooten y col., 1997; Simon y col., 2000; Wang y col., 2005**]. El gradiente de elución seleccionado (Tabla 7 de la Parte Experimental) comienza con un porcentaje de agua muy elevado, lo que permite retardar en la medida de lo posible, los tiempos de retención de los dos compuestos de interés. De esta manera se evita el solapamiento con sustancias interferentes, que eluyen a tiempos de retención muy cortos.

Para establecer las condiciones de detección óptimas de los dos metabolitos, se emplearon los espectros de excitación y emisión, obtenidos mediante espectrofluorimetría. Como se observa en la Tabla 4 de la Parte Experimental, el 3-OH-B[a]P presenta 3 máximos de excitación, a 307, 362 y 379 nm, y 2 máximos de emisión, a 432 y 456 nm, mientras que el 1-OH-P exhibe 1 máximo de excitación a 346 nm y otro de emisión a 389 nm. A nivel cromatográfico, los mejores resultados para el 3-OH-B[a]P, se obtuvieron con las longitudes de onda 308 y 432. Es de destacar que la mayor parte de los autores consultados, emplean longitudes de onda de excitación bastante más bajas que las seleccionadas en este trabajo (entre 233 y 255 nm) [**Van Schooten y col., 1997; Richardson y col., 2004; Wang y col., 2005**]. Efectivamente con estas longitudes de onda tan bajas se alcanza mayor sensibilidad, pero al ser unas condiciones tan poco selectivas, los cromatogramas presentan mayor cantidad de picos que se corresponden con impurezas, las cuales, en ocasiones, se solapan con el analito de interés.

En la **Figura 2** se recoge un cromatograma de un patrón de 1-OH-P (5 µg/L) y 3-OH-B[a]P (2,0 µg/L) con las condiciones de análisis seleccionadas.

---

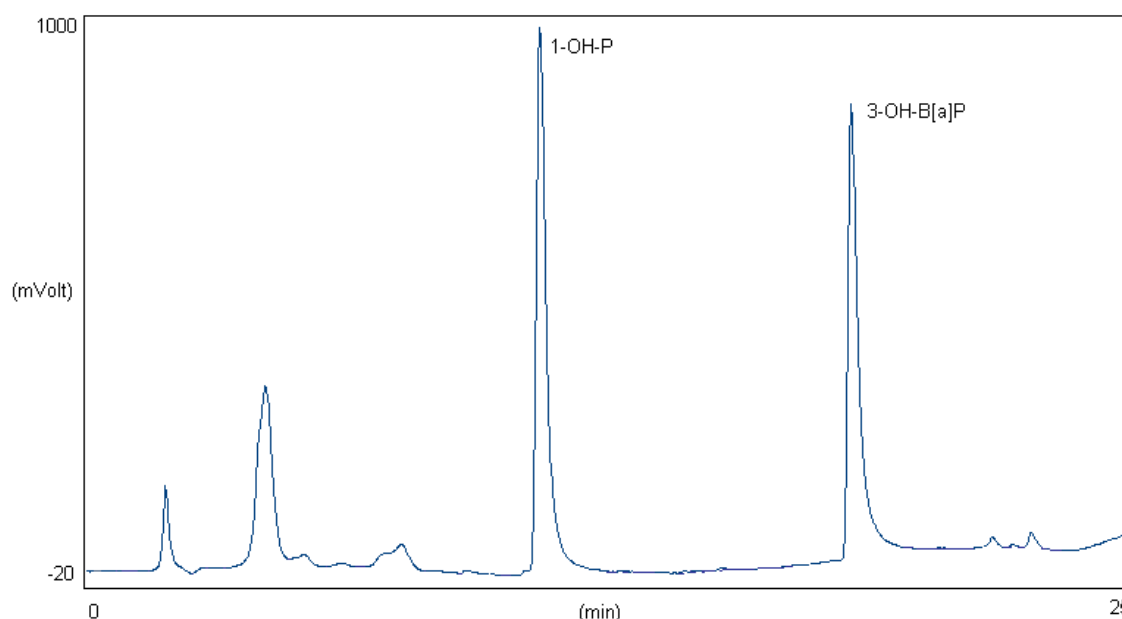
**Richardson, D.M.; Gubbins, M.J.; Davies, I.M.; Moffat, C.F.; Pollard, P.M., 2004.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 17, 79-85.

**Whiton, R.S.; Witherspoon, C.L.; Buckley, T.J., 1995.** Journal of Chromatography B, 665, 390-394.

**Simon, P.; Lafontaine, M.; Delsaut, P.; Morele, Y.; Nicot, T., 2000.** Journal of Chromatography B, 748, 337-348.

**Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

**Wang, Y.; Zhang, W.; Dong, Y.; Fan, R.; Sheng, G.; Fu, J., 2005.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 804-809.



**Figura 2.** Cromatograma de un patrón de 1-OH-P (5,0 µg/L) y 3-OH-B[a]P (2,0 µg/L).

### 3.2. ESTABILIDAD DE LOS ANALITOS EN LAS DISOLUCIONES PATRÓN

Se comprobó que los dos metabolitos estudiados son inestables cuando se encuentran disueltos en acetonitrilo, incluso manteniendo las disoluciones bajo refrigeración, protegidas de la luz y en atmósfera de nitrógeno. Se verificó igualmente que los porcentajes de degradación se incrementaban considerablemente, si las disoluciones se sometían a temperaturas elevadas o se mantenían en atmósfera de oxígeno.

Para prevenir la degradación de los metabolitos se decidió incorporar un antioxidante a las disoluciones patrón, la tert-butil-hidroquinona (TBHQ) (2,0 g/L). Ésta, además de ser muy soluble en acetonitrilo, no interfiere a nivel de la señal cromatográfica de los analitos de interés. Incorporando este antioxidante a las disoluciones madre y manteniéndolas refrigeradas, protegidas de la luz y bajo atmósfera de nitrógeno, permanecen estables durante al menos tres meses. Aún así se recomienda que las disoluciones de trabajo se preparen cada dos o tres semanas, debido a que tienen concentraciones menores. Como se comentará más adelante, la labilidad de estos compuestos dificultará en gran medida el procesamiento de las muestras.

### 3.3. OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO PRE-ANALÍTICO

La optimización de las diferentes etapas pre-analíticas (extracción, deconjugación enzimática y purificación/concentración con C18) se llevó a cabo empleando una muestra de leche sobrecargada con 1-OH-P (2,5 µg/Kg) y 3-OH-B[a]P (1,0 µg/Kg). Previamente se comprobó que este producto no

contenía ninguno de los metabolitos a niveles cuantificables. La legislación vigente no establece un límite máximo para la presencia de estos metabolitos en alimentos infantiles, pero sí establece que el B[a]P no debe superar 1,0 µg/Kg [**Reglamento comunitario 1881/2006**]. De ahí que se seleccionase esta concentración como nivel de sobrecarga para el 3-OH-B[a]P.

### 3.3.1. Extracción

Existen pocos artículos que determinen la presencia de metabolitos en leche [**Grova y col., 2002; Lutz y col., 2006; Zanieri y col., 2007**] y ninguno de ellos contempla el análisis de leche en polvo. En la mayoría de la bibliografía manejada, se analizan muestras de orina [**Whiton y col., 1995; Roth y col., 2001; Lee y col., 2002; Wang y col., 2005**], heces [**Van Schooten y col., 1997**] sangre y otros fluidos biológicos como bilis de pescado [**Richardson y col., 2004; Mazéas y Budzinski, 2005**]. La principal técnica empleada para aislar los metabolitos en matrices líquidas, especialmente en la orina, es la extracción en fase sólida (SPE) con mini columnas C18. La determinación de estos residuos en muestras sólidas, requiere una etapa previa de extracción sólido-líquido con un disolvente apropiado.

- Selección del disolvente de extracción

Los metabolitos son más polares que los PAHs de los que proceden, por ello, mientras que los PAHs se extraen con disolventes como n-hexano o diclorometano [**Rey-Salgueiro y col., 2004; García-Falcón y col., 2005**], sus metabolitos se suelen extraer con metanol [**Van Schooten y col., 1997; Richardson y col., 2004**]. En este trabajo se seleccionó para la extracción, una mezcla de acetonitrilo:acetato de etilo (70:30). Estos disolventes tienen una

---

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

**Grova, N.; Feidt, C.; Laurent, C.; Rychen, G., 2002.** International Dairy Journal, 12, 1025-1031.

**Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

**Zanieri, L.; Galvan, P.; Checchini, L.; Cincinelli, A.; Lepri, L.; Donzelli, G.P.; Del Bubba, M., 2007.** Chemosphere, 67, 1265-1274.

**Whiton, R.S.; Witherspoon, C.L.; Buckley, T.J., 1995.** Journal of Chromatography B, 665, 390-394.

**Roth, M.J.; Qiau, Y.L.; Rothman, N.; Tangrea, J.A.; Dawsey, S.M.; Wang, G.Q.; Cho, S.H.; Kang, D.; Taylor, P.R.; Strickland, P.T., 2001.** Biomarkers, 5, 381-386.

**Lee, W.; Shin, H.S.; Hong, J.E.; Pyo, H.; Kim, Y., 2002.** The Bulletin of the Korean Chemical Society, 24(5), 559-565.

**Wang, Y.; Zhang, W.; Dong, Y.; Fan, R.; Sheng, G.; Fu, J., 2005.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 804-809.

**Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

**Richardson, D.M.; Gubbins, M.J.; Davies, I.M.; Moffat, C.F.; Pollard, P.M., 2004.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 17, 79-85.

**Mazéas, O. y Budzinski, H., 2005.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 985-990.

**Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2004.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3900-3904.

**García-Falcón, M.S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J., 2005.** Food Chemistry, 90, 643-647.

polaridad similar a la del metanol y además, al no llevar ningún grupo funcional con oxígeno, probablemente prevengan la degradación del 1-OH-P y 3-OH-B[a]P durante la extracción. Aún así y para prevenir la oxidación de estos compuestos, se comprobó la necesidad de incorporar TBHQ al disolvente de extracción en una concentración de 0,80 g/L.

También se realizaron diversos ensayos con el fin de determinar el volumen de disolvente necesario, para alcanzar la máxima extracción de los analitos. Se verificó que este volumen estaba condicionado por la siguiente etapa del protocolo analítico, la evaporación. Para eliminar el acetonitrilo: acetato de etilo se emplea una temperatura de 50 °C y corriente de nitrógeno, de manera que cuanto mayor sea la cantidad de disolvente, mayor será el tiempo que los analitos estén sometidos a elevadas temperaturas. Se confirmó que si el volumen superaba los 20 mL, comenzaban a detectarse pérdidas de los compuestos durante esta etapa. Por ello, se estableció que cada muestra debe ser extraída tres veces con un máximo de 20 mL, distribuidos en fracciones de 9,0; 6,0; y 5,0 mL.

Para facilitar la extracción sólido-líquido, se empleó un baño de ultrasonidos, técnica ya utilizada por el grupo de investigación para determinar PAHs en diferentes matrices con la que se obtuvieron resultados satisfactorios [Rey-Salgueiro y col., 2004; García-Falcón y col., 2005; Rey-Salgueiro y col., 2008].

### 3.3.2. Hidrólisis enzimática

Como consecuencia de las reacciones metabólicas de fase II, en las muestras biológicas incluida la leche, pueden estar presentes las formas conjugadas de los metabolitos hidroxilados. Es decir, el glucurónido y el sulfato éster del 1-OH-P y 3-OH-B[a]P. El objetivo de esta etapa sería hidrolizar por vía enzimática las formas conjugadas de los metabolitos, con el fin de liberar 1-OH-P y 3-OH-B[a]P. Para ello se emplean las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa y arilsulfatasa [Whiton y col., 1995; Van Schooten y col., 1997; Simon y col., 2000; Smith y col., 2001; Viau y col., 2002; Richardson y col., 2004;

---

Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3900-3904.

García-Falcón, M.S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J., 2005. *Food Chemistry*, 90, 643-647.

Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J., 2008. *Food Chemistry*, 108, 607-615.

Whiton, R.S.; Witherspoon, C.L.; Buckley, T.J., 1995. *Journal of Chromatography B*, 665, 390-394.

Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33, 317-322.

Simon, P.; Lafontaine, M.; Delsaut, P.; Morele, Y.; Nicot, T., 2000. *Journal of Chromatography B*, 748, 337-348.

Smith, C.J.; Huang, W.; Walcott, C.J.; Turner, W.; Grainger, J.; Patterson Jr, D.G., 2001. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 216-220.

Viau, C.; Diakité, A.; Ruzgýté, A.; Tuchweber, B.; Blais, C.; Bouchard, M.; Vyskocil, A., 2002. *Journal of Chromatography B*, 778, 165-177.

**Mazéas y Budzinski., 2005; Wang y col., 2005; Huang y col., 2006; Lafontaine y col., 2006].**

Teniendo en cuenta que estas enzimas requieren medio acuoso, es necesario evaporar a sequedad el disolvente de extracción (acetonitrilo:acetato de etilo) y redissolver el residuo en 50 mL de buffer acetato amónico:ácido acético (pH 5,5). La muestra se incubó a 37 °C, durante el tiempo suficiente para que las enzimas hidrolizaran por completo los hidroxilados. Los tiempos de incubación recogidos en la bibliografía son muy variados: 1 hora [Simon y col., 1999 y 2000; Richardson y col., 2004], 3 horas [Smith y col., 2001], 4 horas [Wang y col., 2005], 16 horas [Marczynski y col., 2005; Lutz y col., 2006] y 20 horas [Mazéas y Budzinski, 2005].

La puesta a punto de esta etapa resulta complicada, ya que no existen en el mercado patrones de las formas conjugadas de estos dos metabolitos hidroxilados, y tampoco se detectaron los compuestos en ninguna de las muestras de leche analizadas. Lo que sí se pudo confirmar es que esta etapa es indudablemente, la que más va a limitar la recuperación de los dos compuestos hidroxilados. La razón es doble, por una parte el 3-OH-B[a]P es lábil en medio acuoso, incluso en presencia del antioxidante TBHQ, por otra, cuando este antioxidante se incubó durante períodos de tiempo muy largos, libera productos de degradación que se solapan con el pico del 1-OH-P. Estos dos comportamientos se pudieron verificar al realizar las siguientes experiencias: se incorporó 1-OH-P (2,5 µg/L) y 3-OH-B[a]P (1,0 µg/L) en 50 mL de tampón acetato amónico:ácido acético (pH 5,5) con TBHQ y 20 µL de enzima β-glucuronidasa/arilsulfatasa. Estas muestras se incubaron en estufa a 37 °C durante diferentes períodos de tiempo (30 minutos, 2 horas y 8 h). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**, observándose que el 3-OH-B[a]P comienza a degradarse a los 30 minutos de incubación. Las recuperaciones del 1-OH-P son satisfactorias tanto a los 30 minutos como a las dos horas. A las 8 horas, y debido a las interferencias generadas por los productos de degradación del antioxidante (**Figura 3**), los porcentajes de recuperación de este metabolito llegan a alcanzar el 150 %.

---

Mazéas, O. y Budzinski, H., 2005. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 985-990.

Wang, Y.; Zhang, W.; Dong, Y.; Fan, R.; Sheng, G.; Fu, J., 2005. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 804-809.

Huang, W.; Caudill, S.P.; Grainger, J.; Needham, L.L.; Patterson Jr, D.G., 2006. *Toxicology Letters* 163, 10-19.

Lafontaine, M.; Payan, J. P.; Delsaut, P.; Morele, Y., 2000. *The Annals of Occupational Hygiene*, 44,89-100.

Simon, P.; Morele, Y.; Delsaut, P.; Nicot, T., 1999. *Journal of Chromatography B*, 732, 91-101.

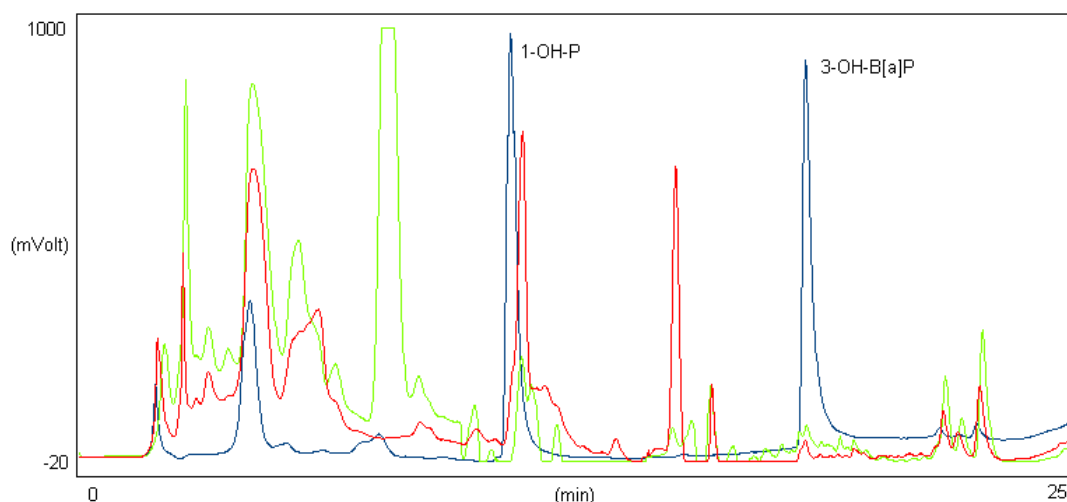
Simon, P.; Lafontaine, M.; Delsaut, P.; Morele, Y.; Nicot, T., 2000. *Journal of Chromatography B*, 748, 337-348.

Richardson, D.M.; Gubbins, M.J.; Davies, I.M.; Moffat, C.F.; Pollard, P.M., 2004. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17, 79-85.

Smith, C.J.; Huang, W.; Walcott, C.J.; Turner, W.; Grainger, J.; Patterson Jr, D.G., 2001. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 216-220.

Marczynski, B.; Preuss, R.; Mensing, T.; Angerer, J.; Seidel, A.; El Mourabit, A.; Wilhelm, M.; Brüning, T., 2005. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 78, 97-108.

Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rycken, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 263-268.



**Figura 3.** Cromatograma correspondiente a un patrón de 1-OH-P y 3-OH-B[a]P (trazo azul) y a una disolución de TBHQ incubada (37 °C) con  $\beta$ -glucuronidasa/arilsulfatasa durante 2h (trazo verde) y 8h (trazo rojo).

De esta experiencia se obtiene que, en caso de que hubiese formas conjugadas del 1-OH-P en los extractos de leche, el tiempo de incubación de las mismas no debería superar las 2 horas, de esta forma se evitaría la liberación de productos de degradación que interfiriesen su señal cromatográfica. Si las muestras contuviesen formas conjugadas del 3-OH-B[a]P, habría que tener en cuenta que a medida que se fuese liberando la forma hidroxilada, ésta se degradaría parcialmente. Es de destacar que prácticamente ningún artículo, tiene en consideración el problema de la inestabilidad del 3-OH-P durante el procesado de las muestras. Algunos autores como **Mazéas y Budzinski., 2005** o **Richardson y col., 2004**, recomiendan adicionar 2-mercaptoethanol y ácido ascórbico al 4,0 %, respectivamente. Otros como **Simon y col., 1999 y 2000**, previenen la degradación incorporando un estabilizante, el tritón X-100R (5,0 g/L).

En este trabajo se intentó mejorar los resultados obtenidos con la TBHQ, sustituyéndola por otros antioxidantes alternativos. Se realizaron experiencias con el butil hidroxi anisol, butil hidroxi tolueno, ácido ascórbico y ácido gálico. El butil hidroxi anisol y el butil hidroxi tolueno se descartaron ya que, tras 2h de incubación con la enzima, se liberan productos de degradación que interfieren cromatográficamente no sólo al 1-OH-P, sino también al 3-OH-B[a]P. Con el ácido ascórbico se obtuvieron % de recuperación semejantes a los alcanzados con la TBHQ y, con el ácido gálico la degradación de los dos analitos es prácticamente total. También se ensayó con el surfactante tritón X-100R,

**Mazéas, O. y Budzinski, H., 2005.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 985-990.

**Richardson, D.M.; Gubbins, M.J.; Davies, I.M.; Moffat, C.F.; Pollard, P.M., 2004.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 17, 79-85.

**Simon, P.; Morele, Y.; Delsaut, P.; Nicot, T., 1999.** Journal of Chromatography B, 732, 91-101.

**Simon, P.; Lafontaine, M.; Delsaut, P.; Morele, Y.; Nicot, T., 2000.** Journal of Chromatography B, 748, 337-348.

obteniéndose % de recuperación muy bajos, 45 % para el 1-OH-P y 16 % para el 3-OH-B[a]P.

Finalmente, se comprobó si el borboteo de la disolución buffer con nitrógeno antes de la incubación, prevenía la degradación de los metabolitos. Los resultados mejoraron, especialmente para el 3-OH-B[a]P, el porcentaje de degradación se disminuye en un 24% a las 2h de incubación (**Tabla 3**). A partir de este tiempo de incubación se el porcentaje de degradación se mantiene constante. Este comportamiento probablemente se deba a que, transcurridas las dos horas, el elemento que provoca la degradación del 3-OH-B[a]P se agote. Quizás este elemento sea el oxígeno residual que prevalece en el buffer, incluso después de borbotearlo con nitrógeno.

Después de todas estas experiencias se decidió mantener la TBHQ como antioxidante, limitar el tiempo de incubación a 2 horas y borbotear la disolución acuosa con nitrógeno durante 2 minutos antes de su incubación.

**Tabla 3.** Recuperaciones de los metabolitos estudiados, obtenidas según el tiempo de incubación en la estufa con y sin corriente de N<sub>2</sub>(%R (RSD), n=3).

Tiempo de incubación	Sin corriente de N <sub>2</sub>		Bajo corriente de N <sub>2</sub>	
	1-OH-P	3-OH-B[a]P	1-OH-P	3-OH-B[a]P
30 min	106 (5,0)	60 (10)	104 (5,2)	85 (5,0)
2 h	75 (8,0)	46 (5,0)	79 (4,0)	70 (5,3)
8 h	150 (8,0)	44 (7,0)	145 (3,3)	76 (7,1)

### 3.3.3. Concentración y purificación a través de mini columna C18

El objetivo de la extracción en fase sólida es doble: incrementar la concentración de los analitos y eliminar posibles impurezas de la muestra. Las mini columnas seleccionadas fueron las Sep-Pack C18, por ser las utilizadas por la mayoría de autores que determinan metabolitos de PAHs [**Whiton y col., 1995; Van Schooten y col., 1997; Simon y col., 1999; Viau y col., 2002; Mazéas y Budzinski., 2005; Wang y col., 2005; Lutz y col., 2006**].

Whiton, R.S.; Witherspoon, C.L.; Buckley, T.J., 1995. Journal of Chromatography B, 665, 390-394.

Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

Simon, P.; Morele, Y.; Delsaut, P.; Nicot, T., 1999. Journal of Chromatography B, 732, 91-101.

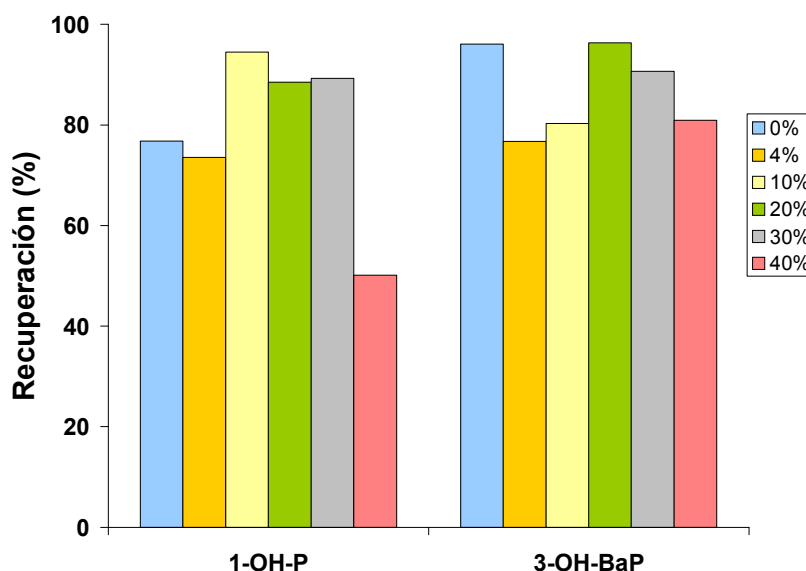
Viau, C.; Diakité, A.; Ruzgyté, A.; Tuchweber, B.; Blais, C.; Bouchard, M.; Vyskocil, A., 2002. Journal of Chromatography B, 778, 165-177.

Mazéas, O. y Budzinski, H., 2005. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 985-990.

Wang, Y.; Zhang, W.; Dong, Y.; Fan, R.; Sheng, G.; Fu, J., 2005. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 804-809.

Antes de pasar los 50 mL de buffer a través de la mini columna, se recomienda incorporar acetonitrilo a la disolución. La adición de este disolvente orgánico aumenta la solubilidad de los metabolitos en agua, evitando su adsorción al material en contacto con la muestra. También facilita la eliminación de impurezas, ya que limita su retención en la mini columna.

Con el fin de establecer el volumen óptimo de acetonitrilo a incorporar, se estudiaron los porcentajes de recuperación obtenidos al añadir distintas proporciones del disolvente (0, 4, 10, 20, 30 y 40%), a 50 mL de tampón acetato amónico:ácido acético sobrecargado con los dos analitos. Como se observa en la **Figura 4**, incorporando un 20% de acetonitrilo se consiguen recuperaciones satisfactorias para ambos compuestos. Con proporciones de acetonitrilo superiores, comienzan a observarse pérdidas del metabolito más polar (1-OH-P), debido a su elución con el disolvente.



**Figura 4.** Recuperación de hidroxí PAHs al pasar a través de la minicolumna de C18, una disolución de buffer:acetonitrilo en diferentes proporciones.

También se realizaron ensayos para determinar la velocidad de paso de las disoluciones, a través de la mini columna C18. Se pensó que las bajas velocidades facilitarían la retención de los metabolitos en el adsorbente, pero se comprobó que los porcentajes de recuperación, empeoraban cuanto menor era la velocidad de paso. El tiempo que la disolución está expuesta a la acción de la luz y del oxígeno es crítico. Largos periodos de exposición provocan la degradación por fotooxidación de los analitos. Por este motivo se recomienda



pasar la muestra, a la mayor velocidad de flujo posible. Se utilizó la velocidad máxima permitida por la estación de vacío, para este tipo de muestras.

La siguiente etapa del método consiste en eluir selectivamente, los metabolitos que han quedado retenidos en la mini columna. En los referentes bibliográficos, para la elución de estos compuestos se emplean disolventes muy diversos, tales como: metanol [Whiton y col., 1995; Van Schooten y col., 1997; Viau y col., 2002; Mazéas y Budzinski., 2005; Wang y col., 2005], diclorometano [Simon y col., 1999], ciclohexano:acetato de etilo (50:50) [Lutz y col., 2006] o acetonitrilo:metanol [Smith y col., 2002].

En este trabajo se ensayó la eficacia de todos los disolventes mostrados en la **Tabla 4**. Como se puede observar, la mejor recuperación se obtiene utilizando como disolvente de elución el diclorometano, el acetonitrilo eluyendo la mini columna en sentido inverso, la mezcla acetonitrilo:diclorometano (50:50) y la mezcla metanol: acetato de etilo. El n-hexano es sin duda, el disolvente con el que se obtienen peores resultados. Considerando que el diclorometano es cancerígeno y que el acetonitrilo es bastante difícil de eliminar posteriormente por evaporación, se decidió seleccionar la mezcla metanol: acetato de etilo.

---

Whiton, R.S.; Witherspoon, C.L.; Buckley, T.J., 1995. Journal of Chromatography B, 665, 390-394.

Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S., 1997. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

Viau, C.; Diakité, A.; Ruzgýté, A.; Tuchweber, B.; Blais, C.; Bouchard, M.; Vyskocil, A., 2002. Journal of Chromatography B, 778, 165-177.

Mazéas, O. y Budzinski, H., 2005. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 985-990.

Wang, Y.; Zhang, W.; Dong, Y.; Fan, R.; Sheng, G.; Fu, J., 2005. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 804-809.

Simon, P.; Morele, Y.; Delsaut, P.; Nicot, T., 1999. Journal of Chromatography B, 732, 91-101.

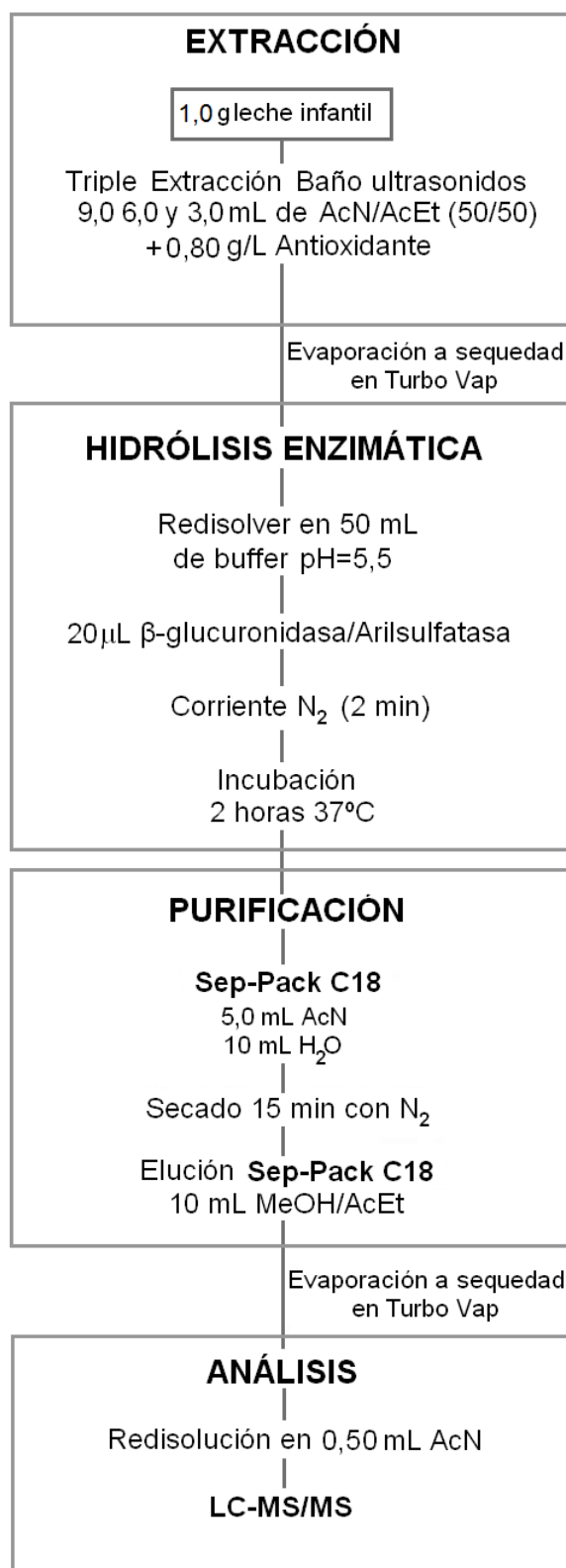
Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rycken, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

Smith, C.J.; Huang, W.; Walcott, C.J.; Turner, W.; Grainger, J.; Patterson Jr, D.G., 2001. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372, 216-220.

**Tabla 4.** Porcentaje de recuperación de los metabolitos estudiados, obtenido para diferentes disolventes de elución (n=3).

Disolvente	V (mL)	%R $\pm$ RSD
acetonitrilo	6,0	80 $\pm$ 13
diclorometano	10	90 $\pm$ 7,0
acetonitrilo (sentido inverso)	6,0	89 $\pm$ 9,0
acetonitrilo : diclorometano (50:50)	6,0	97 $\pm$ 10
acetonitrilo : diclorometano (67:33)	6,0	93 $\pm$ 9,0
n-hexano	6,0	53 $\pm$ 15
n-hexano	10	51 $\pm$ 29
metanol : acetato de etilo (50 %)	10	87 $\pm$ 3,0

El protocolo completo que se siguió finalmente para la determinación de 1-OH-P y 3-OH-B[a]P en leches infantiles, se recoge en la **Figura 5**. Es de destacar que si sólo se quisiesen determinar los metabolitos hidroxilados, se eliminaría la etapa de hidrólisis enzimática.



**Figura 5.** Esquema del protocolo analítico para la determinación de 1-OH-P y 3-OH-B[a]P en leches infantiles.

### 3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para evaluar la precisión (%RSD) y la recuperación (%R) del método, se sobrecargaron tres muestras de leche infantil en polvo, a los niveles de concentración mostrados en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** %R y %RSD de metabolitos, obtenidos al analizar por triplicado una muestra de leche (n°1) sobrecargada (µg/Kg).

Metabolito	Sobrecarga	% R ± %RSD
<b>Protocolo 1</b>		
<b>1-OH-P</b>	78	78 ± 4,5
<b>3-OH-B[a]P</b>	89	89 ± 7,0
<b>Protocolo 2</b>		
<b>1-OH-P totales*</b>	2,5	102 ± 6,5
<b>3-OH-B[a]P totales</b>	1,0	79 ± 7,0

\*totales: hidroxilados + conjugados

La linealidad se chequeó a través de las rectas de calibrado, calculadas para cada analito mediante un análisis de regresión de las concentraciones especificadas en la Tabla 10 de la Parte Experimental, frente a las áreas de los picos. Para ello los patrones de los dos metabolitos en acetonitrilo, se inyectaron directamente en la columna. La cuantificación de las muestras se realiza empleando estas rectas de calibrado, las cuales tienen un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,9993 para el 1-OH-P y 0,9984 para el 3-OH-B[a]P.

## 4. NIVELES DE PAHs NATIVOS Y DE SUS METABOLITOS EN MUESTRAS DE LECHE INFANTIL

### 4.1. DETERMINACIÓN DE PAHs NATIVOS

En este trabajo se analizaron un total de 19 muestras de leche infantil, con el fin de determinar los niveles de 11 PAHs cancerígenos. En ninguna de las muestras analizadas se encontraron PAHs a niveles cuantificables, cumpliendo todas ellas los requerimientos legislativos ( $B[a]P < 1,0 \mu\text{g/Kg}$ ).

Son pocos los artículos en los que se determinan PAHs en fórmulas lácteas infantiles [**Kishikawa y col., 2003; Food Standards Agency, 2006; Aguinaga y col., 2007**]. En general, los resultados encontrados por estos autores son semejantes a los obtenidos en este estudio. La Agencia de Seguridad Alimentaria Británica (FSA) analizó en el año 2006 un total de 97 fórmulas lácteas infantiles comerciales. En 39 de las muestras, se detectó B[a]P a niveles cuantificables pero en ningún caso se sobrepasó la concentración máxima establecida por la UE ( $1,0 \mu\text{g/Kg}$ ). **Kishikawa y col., 2003** analizaron 3 muestras de leche infantil, encontrando igualmente niveles totales de PAHs muy bajos ( $2,0 \pm 0,30 \mu\text{g/Kg}$ ), oscilando la concentración de B[a]P entre  $0,27$  y  $0,39 \mu\text{g/Kg}$ . **Aguinaga y col., 2007**, determinaron 8 de los 11 PAHs seleccionados en este trabajo en una fórmula infantil y tampoco han detectado estos residuos.

Además de las fórmulas infantiles, también hay algunos artículos que estudian otros tipos de muestras de leche. **Zanieri y col., 2007**, analizaron leche procedente de 32 madres lactantes fumadoras y no fumadoras. Los resultados indican que el tabaco contribuye significativamente a la contaminación de la leche materna. Los niveles de PAHs en las 11 muestras de leche procedente de mujeres fumadoras, oscilaron entre  $11 \mu\text{g/Kg}$ , para el Naftaleno y Acenaftaleno, y  $0,10 \mu\text{g/Kg}$  para el antraceno y B[k]F. El B[a]P se encontró en 6 de las muestras y alcanzó los  $0,70 \mu\text{g/Kg}$ . En las madres no fumadoras no se encontraron niveles cuantificables de este último residuo cancerígeno. **Kishikawa y col., 2003**, también determinaron 12 PAHs en muestras de leche materna y leche comercial. La concentración total osciló entre  $0,19$ - $2,2$  y  $0,23$ - $2,0 \mu\text{g/Kg}$ ., respectivamente.

#### 4.2. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE PAHs

Tampoco se encontraron ninguno de los metabolitos hidroxilados o conjugados a niveles cuantificables. Por lo que podemos concluir que las fórmulas infantiles analizadas son totalmente seguras, en lo que respecta a su contenido en PAHs nativos y sus metabolitos. Aún así no se debe descartar la posibilidad de detectar metabolitos de PAHs en alimentos de origen animal, especialmente en la leche.

---

**Kishikawa, N.; Wada, M.; Kuroda, N.; Akiyama, S.; Nakashima, K., 2003.** Journal of Chromatography B, 789, 257-264.

**Food Standards Agency, 2006.** Polycyclic aromatic hidrocarbons in baby foods and infant formulae. Food Surveillance Information Sheet, 09/06. [www.food.gov.uk/news/newsarchive/2006/may/pahsurvey](http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2006/may/pahsurvey).

**Aguinaga, N.; Campilloa, N.; Viñas, P.; Hernández-Córdoba, M., 2007.** Analytica Chimica Acta, 596, (2), 285-290.

**Zanieri, L.; Galvan, P.; Checchini, L.; Cincinelli, A.; Lepri, L.; Donzelli, G.P.; Del Bubba, M., 2007.** Chemosphere, 67, 1265-1274.

**Grova y col., 2000** estudiaron la presencia de PAHs nativos, en leche procedente de vacas criadas en zonas rurales y vacas criadas en zonas urbanas muy contaminadas. No encontraron diferencias significativas en el contenido de estos compuestos en ambas muestras. Este resultado les llevó a pensar que posiblemente los PAHs a los que están expuestas las vacas, sean rápidamente metabolizados por el animal, migrando a la leche en forma de metabolito y no en forma nativa. Por ello, realizaron una segunda experiencia que consistió en administrar PAHs oralmente y de forma crónica a cabras lactantes, evaluando la transferencia de éstos y sus metabolitos a la leche [**Grova y col., 2006**]. Los resultados obtenidos fueron semejantes a los que encontraron **Lutz y col., 2006**, en un ensayo similar realizado con vacas. Ambos autores detectaron PAHs nativos con menos de cinco anillos bencénicos, tanto en las muestras control como en las leches procedentes de animales expuestos a residuos, pero sin observar diferencias significativas entre ellas. Por otra parte, encontraron un incremento considerable en los niveles de algunos metabolitos hidroxilados (2-OH-Fluoreno, 3-OH-Fenantreno y 1-OH-P), en la leche de los animales alimentados con PAHs. En ninguno de los ensayos se detectaron niveles cuantificables de 3-OH-B[a]P. Por todo ello, los investigadores concluyen que los PAHs con más de cinco anillos bencénicos probablemente no sean capaces de traspasar la barrera intestinal, por lo que no se transfieren a la leche ni en forma nativa ni como metabolitos. Aún así, estos mismos autores sugieren que los trabajos de este tipo realizados hasta el momento son muy escasos, y los resultados no son del todo concluyentes, por lo que recomiendan continuar investigando en esta línea. También sugieren que desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, no sólo deberían determinarse los PAHs nativos en la leche de consumo humano, sino también sus metabolitos.

---

**Grova, N.; Laurent, C.; Feidt, C.; Rychen, G.; Laurent, F.; Lichtfouse, E., 2000.** European Journal of Mass Spectrometry, 6 (5), 457-460.

**Grova, N.; Rychen, G.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Feidt, C., 2006.** Agronomy for Sustainable Development, 26, 195-199.

**Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rychen, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

## Capítulo IV

---





## Estudio de la presencia de PAHs nativos y sus metabolitos en excretas procedentes de animales de cría

Al igual que el hombre, los animales incorporan los PAHs al organismo principalmente a través de la dieta, llegando a aportar los piensos, el forraje y el agua, hasta el 99 % de estos residuos [**Ciganek y col., 2002**]. **Ciganek y col., 2002**, comprobaron que la ingesta total de PAHs por una cabaña de vacas estabuladas, podía alcanzar los 14 mg diarios. Estos mismos autores encontraron elevadas concentraciones de PAHs en los forrajes (278 µg/Kg) y piensos (entre 82 y 128 µg/Kg), empleados para la alimentación de vacas y cerdos. Datos referentes a los programas de control llevados a cabo entre los años 2000-2004 por el Instituto de Seguridad Alimentaria Holandés, demuestran que la concentración de PAHs cancerígenos en ingredientes destinados a la producción de piensos son elevados, oscilando los niveles del B[a]P entre los 2,0 y los 10 µg/Kg [**Bulder y col. 2006**]. También hay ensayos en los que se determina la presencia de estos residuos en pastos (hierba y suelo) próximos a zonas muy industrializadas, frente a pastos procedentes del medio rural [**Crépineau y col., 2003**]. Al pastar, las vacas, y en general todos los herbívoros, no sólo ingieren hierba, sino que también incorporan entre un 0,50-18 % de suelo. Considerando que los suelos, debido a su elevado contenido en materia orgánica, tienen gran capacidad para fijar PAHs, la ingestión accidental de esta matriz contribuye a incrementar la exposición de los animales herbívoros a los PAHs. La concentración total de estos residuos encontrada por **Crépineau y col., 2003** en hierba y suelo muestreados en zonas industrializadas, fue elevada, oscilando entre 0,77-3,9 mg/Kg. En cambio, la carga de PAHs en las muestras control (medio rural) fueron entre 4 y 8 veces menores.

Una vez en el organismo, los PAHs son rápidamente transformados en diferentes metabolitos de fase I (hidroxilos, dihidroles, dihidrodiol-epóxidos, quinonas, etc) y fase II (formas conjugadas de los anteriores compuestos). Los productos resultantes de la metabolización de PAHs son eliminados principalmente por vía fecal y urinaria. Los metabolitos con 2 y 3 anillos aromáticos, como el 1-OH-P y sus formas glucurónidas, son preferentemente excretados en la orina, mientras que los de mayor peso molecular, como el 3-OH-B[a]P y sus formas glucurónicas, se excretan en las heces [**Jacob y Grimmer, 1996**].

---

**Ciganek, M.; Ulrich, R.; Neca, J.; Raszyk, J., 2002.** Veterinarni Medicina, 47(5), 137-142.

**Bulder, A. S.; Hoogenboom, L. A. P.; Kan, C. A.; Raamsdonk, L. W. D.; Bouwmeester, H., 2006.** Initial risk assessment of PAHs in feed (materials). Institute of Food Safety, Netherlands. [http://library.wur.nl/wasp/bestanden/LUWPUBRD\\_00352428\\_A502\\_001.pdf](http://library.wur.nl/wasp/bestanden/LUWPUBRD_00352428_A502_001.pdf).

**Crépineau, C.; Rychen, G.; Feidt, C.; Le Roux, Y.; Lichtfouse, E.; Laurent, F., 2003.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4841-4845.

**Jacob J.; Grimmer G., 1996.** Central European Journal of Public Health., 4 Suppl., 33-39.

El análisis de hidroximetabolitos en fluidos biológicos, especialmente 1-OH-P en orina, se utiliza habitualmente en medicina, para evaluar la exposición del hombre a los PAHs [**Mastandrea y col., 2005**]. También hay algún ensayo a nivel veterinario, que demuestra que la concentración de estos metabolitos en las excretas de los animales, se correlacionan con su nivel de exposición a los PAHs [**Raszyk y col., 1999; Chahin y col., 2008**].

En este Capítulo se estudiará la presencia de PAHs nativos y algunos de sus metabolitos, en las excretas de diferentes animales, algunos de ellos productores de alimentos. El objetivo se centra en evaluar el grado de exposición a PAHs, al que está sometida la cabaña ganadera. Este trabajo también tiene interés desde el punto de vista agrario, ya que en numerosas ocasiones, el estiércol es utilizado como abono orgánico en cultivos. Aunque los PAHs tienen poca capacidad para acceder a las plantas a través del sistema radicular, debido a su afinidad por la materia orgánica del suelo, los metabolitos, al ser más hidrofílicos, son más biodisponibles e incluso más tóxicos. Además, la flora microbiana de los estiércoles, facilita la metabolización de los posibles PAHs nativos.

## 1. MUESTREO

Se han analizado muestras representativas de excretas procedentes de diferentes tipos de animales: caballo, cerdo, conejo y vaca. En el caso del caballo, se recogieron heces de animales salvajes que pastan libremente en una zona periurbana próxima a Vigo. Las excretas del cerdo se recogieron en forma de purín (heces y orina), mientras que las de conejo y vaca, en forma de estiércol (heces, orina y restos vegetales). Todas ellas se obtuvieron de granjas familiares ubicadas en la misma zona. Tras la recogida, las muestras se liofilizaron, se homogeneizaron y se mantuvieron bajo refrigeración (0-4°C) hasta que fueron analizadas, por duplicado, siguiendo los protocolos recogidos en **Figuras 1 y 2** para la determinación de PAHs e hidroximetabolitos y sus formas conjugadas.

---

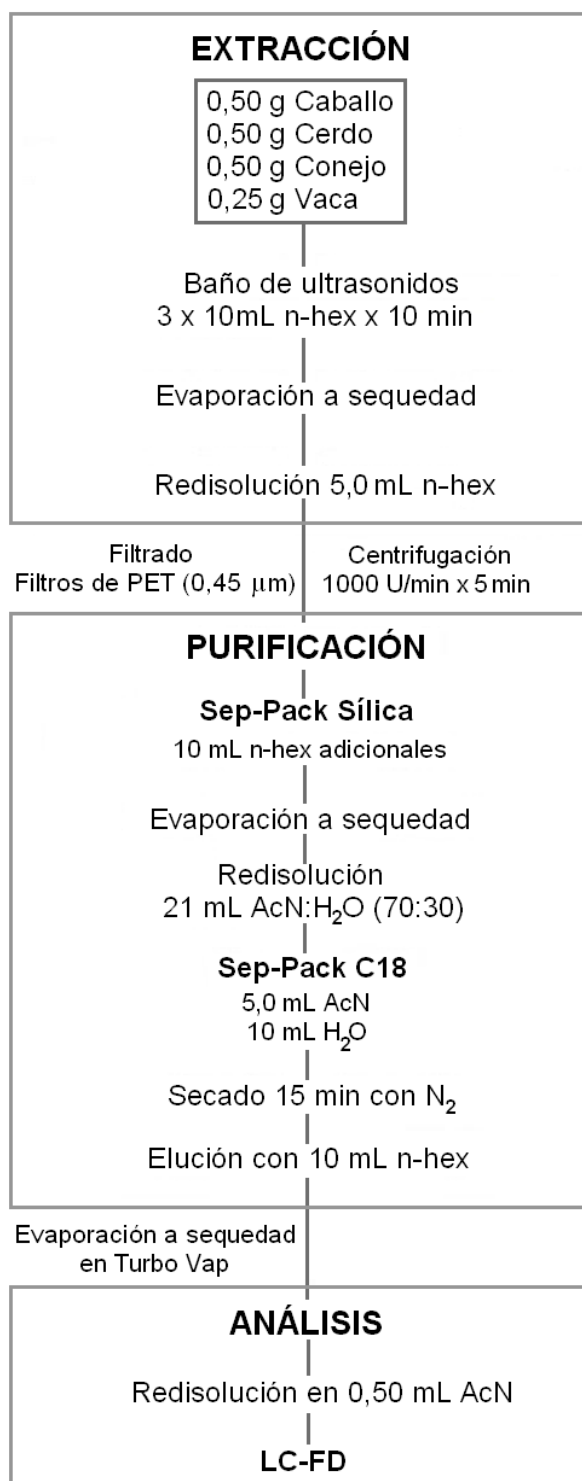
**Mastandrea, C.; Chichizola, C.; Ludueña, B.; Sánchez, H.; Álvarez, H.; Guitiérrez, A., 2005.** Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 39, 27-36.

**Raszyk, J.; Neca, J.; Salava, J.; Palac, J., 1999.** Veterinarni Medicina, 44, 359-363.

**Chahin, A., Guivarc'h, Y.P., Dziurla, M.-A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2008.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (5), 1780-1786.

## 2. DETERMINACIÓN DE PAHs

Se determinaron 11 PAHs (B[a]A, Chr, 5-MChr, B[*j*]F, B[b]F, B[k]FA, B[a]P, DB[*ah*]A, DB[a]P, B[*ghi*]P, I[1,2,3-cd]P), todos ellos reconocidos por la Unión Europea como posibles cancerígenos. Como se muestra en la **Figura 1**, el método seguido para el análisis, es algo más complejo que el empleado para turbas, vegetales o leche, ya que presenta una etapa adicional de purificación mediante minicolumnas C18. La purificación con sílica no fue suficiente para obtener un extracto limpio y sin interferencias. Por ello, tras pasar el eluato de n-hexano a través de la sílica, se evaporó a sequedad, redisolviendo el residuo en una mezcla de acetonitrilo:agua (70:30) que se purifica a través de una C18. Finalmente, los PAHs retenidos se eluyen con 10 mL de n-hexano. Una etapa semejante, ya ha sido empleada satisfactoriamente por el equipo de investigación, para determinar PAHs en aguas de bebida y esorrentía [**García-Falcón y col., 2004; García-Falcón y col., 2004**].



**Figura 1.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs nativos en excretas y estiércoles animales.

La recuperación (%R) y la precisión (% RSD) del método (**Tabla 1**) se evaluaron sobrecargando por triplicado una muestra de estiércol de conejo, a los niveles de concentración mostrados en la **Tabla 1**. Antes de ser procesadas siguiendo el protocolo analítico descrito anteriormente, las muestras se

mantuvieron durante 24 horas para facilitar el correcto reparto de los analitos en la matriz.

**Tabla 1.** %R% y RSD obtenidos al analizar por triplicado una muestra de estiércol de conejo sobrecargado ( $\mu\text{g/Kg}$ ).

PAHs	Sobrecarga	%R	%RSD
B[a]A	0,84	82	3,0
Chr	5,0	85	2,0
5-MChr	5,0	103	2,0
B[j]F	14	112	11
B[b]F	1,5	84	13
B[k]F	0,20	93	20
B[a]P	0,52	87	14
DB[a,l]P	6,0	98	15
DB[a,h]A	1,8	97	10
B[ghi]P	14	98	9,0
I[1,2,3-cd]P	7,3	99	6,9

Una vez comprobado que el método propuesto es válido para la extracción de PAHs de las muestras de excretas y estiércol, se han calculado los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) (**Tabla 2**) [ACS, 1980].

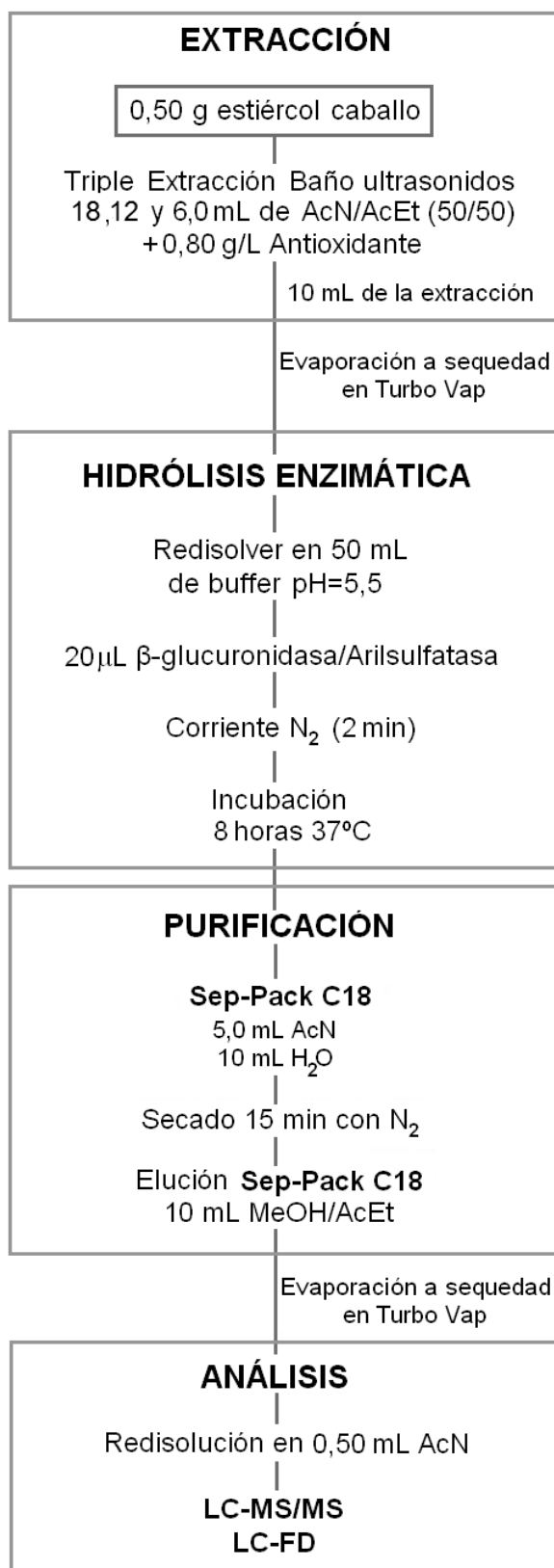
**Tabla 2.** Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en excretas ( $\mu\text{g/Kg}$  n=6).

PAHs	LD	LC
B[a]A	0,16	0,40
Chr	1,0	3,0
5-MChr	0,50	1,4
B[j]F	2,6	7,0
B[b]F	0,34	1,0
B[k]F	0,040	0,10
B[a]P	0,10	0,30
DB[a,l]P	0,66	2,0
DB[a,h]A	0,20	1,0
B[ghi]P	2,8	7,0
I[1,2,3-cd]P	1,4	4,0

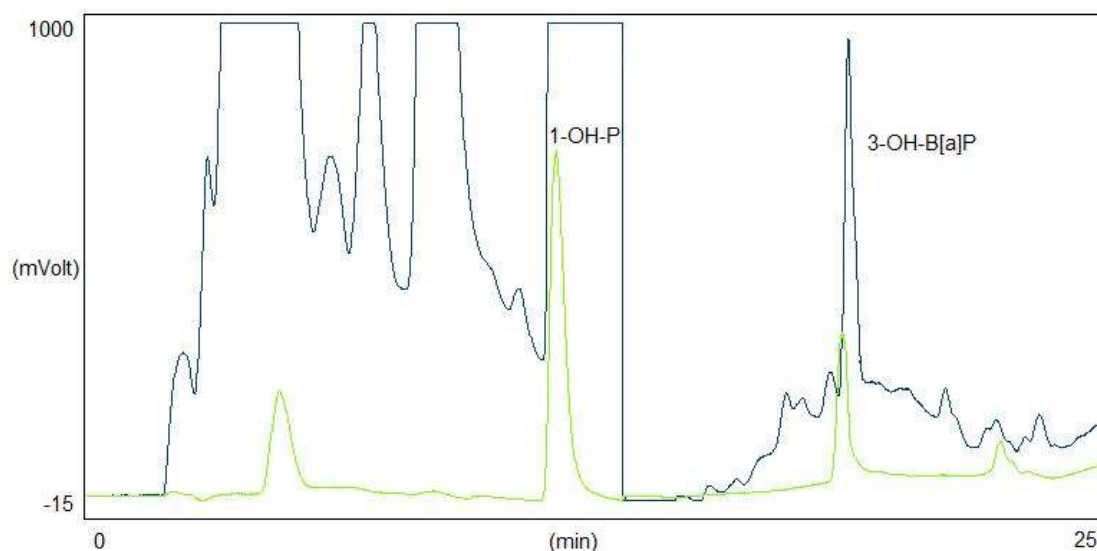
### 3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE PAHs

El método analítico de partida empleado para la determinación de metabolitos de PAHs en estiércoles, ha sido el propuesto en el Capítulo III. El tamaño de muestra seleccionado, es muy importante para obtener resultados reproducibles. En un principio, se partió de 0,25 g de estiércol, comprobándose que al someter la muestra por triplicado, al protocolo analítico optimizado en el Capítulo III (**Figura 2**), se obtenían %RSD muy elevados, que oscilaban entre el 31 y el 80 % para el 3-OH-B[a]P libre y entre el 20 y el 30 % para el 3-OH-B[a]P total (la suma de la forma libre y conjugada). En una segunda aproximación se partió de 0,50 g de estiércol, duplicando el volumen del disolvente de extracción (18, 12 y 6,0 mL). Se continuó el protocolo procesando solamente una parte alícuota, correspondiente a la mitad del extracto final (20 mL), con lo que se consiguió disminuir la matriz del extracto resultante y con ello, la variabilidad de los resultados, obteniéndose valores finales con %RSD inferiores al 5,0 %.

Como se puede observar en la **Figura 3**, la zona de elución del 1-OH-P está muy interferida, lo que imposibilita su cuantificación. Se trató de eliminar interferencias, sometiendo al extracto de metanol:acetato de etilo, a una purificación adicional con sílica, tras el paso a través de la C18. Los resultados no fueron satisfactorios, ni tampoco se pudo mejorar la resolución del compuesto, al ensayar otros gradientes alternativos. Finalmente, se decidió centrar el estudio exclusivamente en el 3-OH-B[a]P y sus formas conjugadas.



**Figura 2.** Esquema del protocolo para la determinación de metabolitos de PAHs en excretas y estiércoles animales.



**Figura 3.** Cromatogramas correspondientes a una muestra de excreta de caballo y a un patrón de 1-OH-P (5,0 µg/L) y 3-OH-B[a]P (2,0 µg/L).

En el Capítulo III, se ha explicado la dificultad que presentaba la optimización de la etapa de hidrólisis enzimática, debido a la inexistencia de patrones comerciales de las formas conjugadas del 1-OH-P y 3-OH-B[a]P, por lo que sería necesario contar con matrices que los contuviesen de forma natural. En la leche no se encontraron ninguno de estos compuestos pero se comprobó que, especialmente los estiércoles de caballo, contenían metabolitos de 3-OH-B[a]P, tanto en su formas libre como conjugada. Por ello, se empleó esta muestra para verificar si el tiempo de incubación estimado con anterioridad (2 h), sería el suficiente para liberar todas las formas conjugadas.

### 3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Diferentes muestras de estiércol de caballo fueron extraídas de acuerdo con protocolo descrito en la **Figura 2** con el fin de obtener las formas del 3-OH-B[a]P. Una vez redissuelto el extracto en el buffer y añadida la enzima, se ensayaron diferentes tiempos de incubación (2, 4, 8, 15 y 21 h) en estufa a 37 °C, con el fin de comprobar el tiempo necesario para que la enzima rompiera las formas conjugadas. Paralelamente, debido a la inestabilidad del 3-OH-B[a]P, se incubaron durante los mismos tiempos, extractos de estiércol procesados de la misma manera pero sin la adición de la enzima.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**, observándose como en las dos primera horas de incubación, el 3-OH-B[a]P libre que presenta la muestra, se degrada en un 25%, momento a partir del cual los niveles se mantienen constantes. Como ya se comentó en el Capítulo anterior, este comportamiento se debe al agotamiento del oxígeno residual que prevalece, incluso tras borbotear la disolución buffer con nitrógeno. Los niveles de 3-OH-totales (forma libre + conjugada) aumentaron progresivamente hasta alcanzar



los 10 µg/Kg a las 8 h, a partir de aquí no se observan incrementos significativos. Concluyendo, por tanto, que las dos horas de incubación que se sugerían en el Capítulo anterior, no son suficientes para alcanzar la hidrólisis enzimática completa de las formas conjugadas del 3-OH-B[a]P, debiendo ampliarse a 8 h. Lo que sí es importante destacar es que, tal y como ya se verificó en el Capítulo anterior, tiempos de incubación superiores a dos horas, son incompatibles para la determinación del 1-OH-P. A partir de este tiempo, el antioxidante tert-butil-hidroquinona (TBHQ), comienza a generar productos de degradación, que eluyen a tiempos de retención coincidentes con el 1-OH-P. Como ya se apuntó anteriormente, en este Capítulo se centrará el estudio exclusivamente en el 3-OH-B[a]P y sus formas conjugadas, por lo que se seleccionará como tiempo de incubación enzimática 8 h.

**Tabla 3.** Optimización de la etapa de hidrólisis enzimática del 3-OH-B[a]P en excretas de caballo (µg/Kg+s.d.).

Incubación	3-OH-B[a]P	
	Libres	Totales*
0	9,0 + 0,63	-
2	7,0 + 0,49	6,0 + 0,42
4	6,0 + 0,42	8,0 + 0,56
8	7,0 + 0,49	10 + 0,70
15	6,5 + 0,45	9,0 + 0,63
21	6,6 + 0,46	11 + 0,77

Totales\*: libres + conjugados.

### 3.2. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE LC-MS/MS

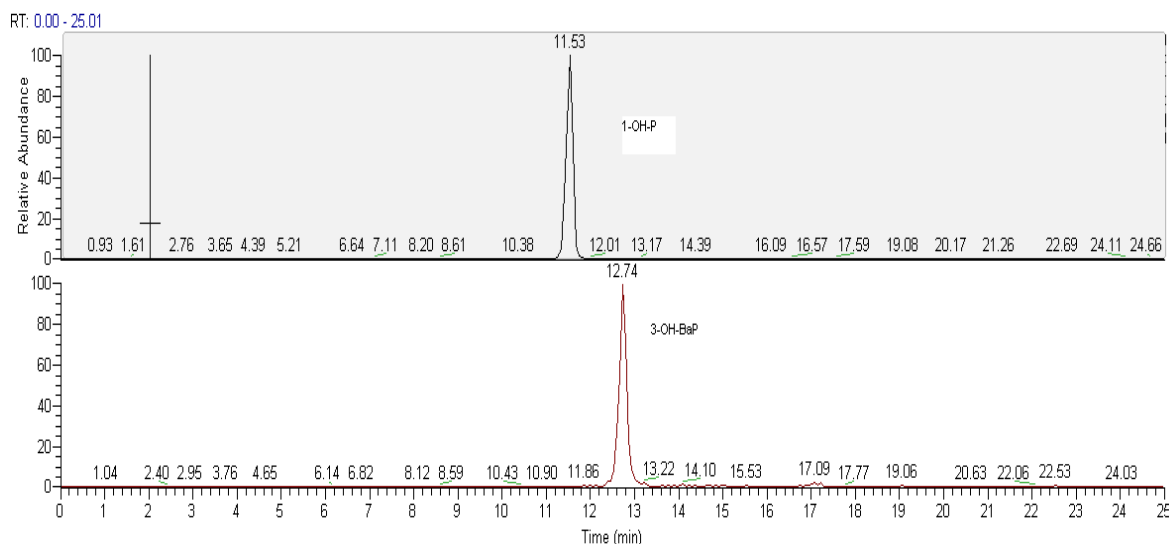
Aunque la zona de elución del 3-OH-B[a]P no está interferida, se optó por buscar una segunda técnica de confirmación de los resultados. Según la bibliografía consultada, la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas, es una de las técnicas alternativas más utilizadas para la detección de este tipo de compuestos [Fan y col., 2006; Jacob y col., 2007; Jiang y col., 2007]. La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas y por tanto, permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z). La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) consiste en obtener un segundo espectro de masas a partir de un primero, es decir, después de la

Fan, Z.; Jung, K.H.; Lioy, P.J., 2006. Environmental Science and Technology 40(19), 6051-6057.

Jacob III, P., Wilson, M.; Benowitz, N.L., 2007. Analytical Chemistry 79(2), 587-598.

Jiang, D.-E.; Sumpter, B.G.; Dai, S., 2007. Journal of Chemical Physics 127 (12), art. no. 124703.

fragmentación de una molécula con la consiguiente formación de varios fragmentos iónicos. Es necesario volver a fragmentar uno de los fragmentos obtenidos anteriormente de modo que se forman nuevos fragmentos o se intensifican algunos de los ya existentes. A partir de un denominado ión padre o ión precursor obtenido de la primera fragmentación, obtenemos de una segunda fragmentación los denominados iones hijos o iones productos. Debido a sus características estructurales, pueden ser detectados tanto en modo de ionización positivo [Fan y col., 2006; Jiang y col., 2007] como negativo [Jacob y col., 2007] En este trabajo se optó por la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en modo negativo, puesto que ofrecía una mayor selectividad. Dicha técnica nos ha permitido la separación e identificación de los dos metabolitos objeto de estudio, utilizando los parámetros que se muestran en la Parte Experimental y las reacciones de transición (m/z) 217→189 para el 1-OH-P y 269 → 239 para el 3-OH-B[a]P con energías de colisión de 35 y 42 eV, respectivamente. El cromatograma obtenido bajo estas condiciones se muestra a continuación (**Figura 4**). Esta técnica, aplicada a la muestra de caballo, nos permitió confirmar que las excretas contenían no sólo 3-OH-B[a]P, sino también 1-OH-B[a]P, aún a pesar de no poder cuantificarlo de manera exacta. Esto fue debido a que el efecto matriz que presentaban los extractos era lo suficientemente importante como para no obtener resultados reproducibles, incluso mediante sucesivas diluciones. Una posible solución a este problema sería una limpieza más exhaustiva del mismo o bien, su corrección mediante el uso de un estándar interno.



**Figura 4.** Cromatograma correspondiente a un patrón de 1-OH-P y 3-OH-B[a]P mediante LC-MS/MS en modo negativo.

Fan, Z.; Jung, K.H.; Lioy, P.J., 2006. Environmental Science and Technology, 40(19), 6051-6057.

Jiang, D.-E.; Sumpter, B.G.; Dai, S., 2007. Journal of Chemical Physics, 127 (12), art. no. 124703.

Jacob III, P., Wilson, M.; Benowitz, N.L., 2007. Analytical Chemistry 79(2), 587-598.

#### 4. NIVELES DE PAHs NATIVOS Y SUS METABOLITOS EN EXCRETAS Y ESTIÉRCOLES ANIMALES

Se determinó la presencia de PAHs en estiércol de diferentes animales de las explotaciones agrícolas de la provincia de Pontevedra, con el fin de evaluar el grado de contaminación al que están expuestos dichos animales.

En la **Tabla 4** se recogen los niveles de los diferentes PAHs y metabolitos estudiados, incluyendo también los factores de toxicidad equivalente para los primeros.

**Tabla 4.** Concentraciones de PAHs y metabolitos en excretas y estiércoles ( $\mu\text{g/kg} \pm \text{s.d.}$ ,  $n=2$ ), junto con factores de toxicidad equivalentes (FTE).

Compuestos	FTE	Vaca	Conejo	Caballo	Cerdo
B[a]A	0,10	-	-	-	-
Chr	0,010	-	-	-	-
5-MChr	0,010	-	-	-	-
B[ <i>j</i> ]F	0,10	-	-	-	-
B[ <i>b</i> ]F	0,10	$4,7 \pm 0,40$	$2,4 \pm 0,070$	$1,4 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,10$
B[ <i>k</i> ]F	0,10	$1,8 \pm 0,20$	$0,90 \pm 0,030$	$0,40 \pm 0,050$	$0,40 \pm 0,040$
B[a]P	1,0	$2,5 \pm 0,20$	$1,1 \pm 0,080$	$0,80 \pm 0,080$	$1,1 \pm 0,10$
DB[a, <i>i</i> ]P	5,0	-	-	-	-
DB[a, <i>h</i> ]A	5,0	-	-	-	-
B[ <i>ghi</i> ]P	0,010	-	-	-	-
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	0,10	-	-	-	-
3-OH-B[a]P	Libres	$1,2 \pm 0,040$	-	$8,8 \pm 0,080$	$1,1 \pm 0,020$
	Conjugados	$0,50 \pm 0,050$	-	$3,9 \pm 0,11$	$0,40 \pm 0,020$
$\Sigma\text{PAHs}$		9,0	4,4	2,6	2,5
FTE		3,1	1,4	1,0	1,2
$\Sigma\text{PAHs}+3\text{-OH-B[a]P}$		10	4,4	15	4,0

Los niveles totales de PAHs oscilaron entre los  $2,5 \mu\text{g/Kg}$  para el cerdo y los  $9,0 \mu\text{g/Kg}$  para la vaca. En todas las muestras se detectaron B[*k*]F, B[*b*]F y B[a]P. Con respecto a los metabolitos, fue la muestra de caballo la que presentó un mayor nivel de contaminación ( $13 \mu\text{g/Kg}$ ), mientras que en el estiércol de cerdo, no se encontraron estos compuestos a niveles cuantificables. Atendiendo al contenido total de PAHs y metabolitos, se puede concluir que son las vacas ( $10 \mu\text{g/Kg}$ ) y los caballos ( $15 \mu\text{g/Kg}$ ), los animales

más expuestos a estos contaminantes. Para tratar de explicar estas diferencias, y considerando que la ingestión constituye la principal vía de exposición de los animales a los PAHs, se comentará cuál es la base de la dieta, de las cuatro especies estudiadas en este trabajo. Los cerdos, que están permanentemente estabulados, se alimentan a base de piensos. Los conejos, que tampoco tienen acceso al exterior, consumen, además de piensos, alimentos vegetales recogidos en las cercanías de la granja. Las vacas pastan diariamente en prados próximos a las explotaciones, completando la alimentación con piensos, heno y forrajes. Por último, los caballos que viven en libertad, se alimentan exclusivamente de los pastos de la zona de Marcosende, un área periurbana de Vigo. Aunque la legislación europea no regula los límites máximos de PAHs en los piensos animales ni en sus materias primas, la mayor parte de las empresas tienen programas de control de estos residuos. Hecho podría explicar el que los cerdos, que se alimentan exclusivamente de pienso, presenten la menor exposición a PAHs. Tanto las vacas como los caballos, tienen acceso a los pastos de Marcosende. Estos pastos probablemente tengan una elevada carga contaminante, teniendo en cuenta la proximidad a esta localidad, una gran ciudad con alto nivel de contaminación, y a la autovía A-52, con abundante tráfico. Además, estos animales al pastar, ingieren un alto porcentaje de suelo [**Crépineau y col., 2003**], matriz en la que abundan los PAHs, debido a su afinidad por la materia orgánica. Todo ello, unido a que las vacas y los caballos ingieren unas raciones alimentarias muy superiores a las de los conejos o los cerdos, explicaría el que sean precisamente esas dos especies animales, las que están más expuestas a los contaminantes. Además, los animales que pasan mayor parte del tiempo pastando en el exterior, podrían estar más expuestos a los PAHs por inhalación.

La deposición atmosférica de PAHs sobre las plantas es considerada la mayor fuente de contaminación de los alimentos de origen vegetal [**Raszyk y col., 1999**]. En la literatura manejada, se recoge que las mayores concentraciones de PAHs se encuentran en los tejidos aéreos de las plantas con una mayor superficie de exposición atmosférica [**Kipopoulou y col., 1999; Böhme y col., 1999; Barber y col., 2004**]. **Podlešáková, 1998**, evaluó el contenido de 12 PAHs en 83 muestras de plantas de forraje muestreadas en una región central de Bohemia. Los PAHs detectados más frecuentemente

---

Crépineau, C.; Rychen, G.; Feidt, C.; Le Roux, Y.; Lichtfouse, E.; Laurent, F., 2003. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4841-4845.

Raszyk J.; Gajduskova V.; Ulrich R.; Jarosova A.; Napravnik A.; Salava J.; Palac J., 1998. Veterinarni Medicina, 3, 233-238.

Kipopoulou, A.M.; Manoli, E.; Samara, C., 1999. Environmental Pollution, 106, 369-380.

Böhme, F.; Welsch-Pausch, R.; McLachlan, M.S., 1999. Environmental Science and Technology, 33, 1805-1813.

Barber, J. L.; Thomas, G. O.; Kerstiens, G.; Jones, K. C., 2004. Environmental Pollution, 128, 99-138.

Podlešáková, E.; Němeček, J.; Vácha, R.; Pastuszková, M., 1998. Toxicological and Environmental Chemistry, 66 (1-4), 91-103.

fueron el fenantreno, B[g,h,i]P y Chry, oscilando el sumatorio total de PAHs entre 36 y 76  $\mu\text{g/Kg}$ . El B[a]P fue detectado en un rango comprendido entre 1,0 y 1,6  $\mu\text{g/Kg}$ .

**Ciganek y col., 2002**, que evaluaron la exposición diaria a PAHs a la que están sometidos cerdos y vacas de diferentes granjas, encontraron resultados concordantes con los obtenidos en este trabajo. Para ello, determinaron la carga de PAHs en piensos, forrajes, agua de bebida y suelos. Los niveles que detectaron en los alimentos destinados a los cerdos fueron: 100 ng/L en agua de bebida y 82  $\mu\text{g/kg}$  en los piensos. En el caso de Los alimentos destinados a las vacas, los niveles de PAHs detectados fueron 38 ng/L en agua, 128  $\mu\text{g/kg}$  en piensos, 278  $\mu\text{g/kg}$  en forraje, y 1356  $\mu\text{g/kg}$  en suelos cercanos a la granja. Estos mismos autores comprobaron que cada cerdo y vaca recibieron a través de la vía respiratoria 0,0025  $\mu\text{g}$  y 0,0056  $\mu\text{g}$  del sumatorio de 16 PAHs por kg de peso corporal y día, respectivamente. De los resultados se desprende que la exposición a la que estaba sometido el ganado vacuno era 20 veces mayor, que la exposición del ganado porcino por Kg/día. Es decir, que influyen tanto sus características fisiológicas, peso y tamaño, como sus hábitos dietéticos.

**Raszyk y col., 1999**, realizaron un estudio muy completo y determinaron la contaminación a la que estaba expuesto el ganado porcino y vacuno, en una región de la República Checa. Estos autores comprobaron que el ganado vacuno presenta niveles de exposición a PAHs superiores al ganado porcino, atribuyéndolo a que las vacas, pasan mayor tiempo fuera de la explotación, pastando al aire libre. Este hecho también sirve para explicar, las diferencias que encontraron entre terneros y vacas adultas. Los terneros, al estar la mayor parte del tiempo estabulados, no están expuestos a la contaminación medioambiental. En este estudio también se concluyó, que los animales de granjas próximas a áreas industrializadas presentan mayores niveles de PAHs en sus fluidos biológicos, que los animales de granjas del medio rural.

Otro de los resultados que también llama la atención en el presente trabajo, es que la proporción de metabolitos frente a PAHs nativos, es muy superior en las excretas de caballo que en las de vaca. Este resultado podría indicar que el B[a]P se metabolizase más activamente en los caballos, ya sea a nivel intestinal por la acción de la microbiota, o bien en el hígado tras su absorción. En cambio, para la vaca, el B[a]P se eliminaría sin sufrir un proceso metabólico tan activo. Los resultados encontrados en la bibliografía al respecto, son en algunos casos contradictorios. **Lutz y col., 2006**, incorporaron PAHs en la dieta de una cabaña de vacas, concluyendo que los PAHs con más de cinco

---

Ciganek, M.; Ulrich, R.; Neca, J.; Raszyk, J., 2002. Veterinarni Medicina, 47(5), 137-142.

Raszyk J.; Gajduskova V.; Ulrich R.; Jarosova A.; Napravnik A.; Salava J.; Palac J., 1998. Veterinarni Medicina, 3, 233-238.

Lutz, S.; Feidt, C.; Monteau, F.; Rycken, G.; Le Bizec, B.; Jurjanz, S., 2006. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 263-268.

anillos bencénicos, probablemente no sean capaces de traspasar la barrera intestinal, eliminándose como tal en las heces. En cambio, **Van Schooten y col., 1997**, comprobó que del total del B[a]P suministrado a ratas oralmente en forma de disolución, tan sólo una pequeña proporción se elimina sin metabolizar, encontrándose la mayor parte, en forma de 3-OH-B[a]P en las heces. En un trabajo similar realizado por **Hecht y col., 1979** (recogido por **Van Schooten y col., 1997**), se comprueba que del total de B[a]P suministrado a ratas oralmente, se recupera un 74 - 79 % en las heces, del cual, tan sólo el 5,6 - 13 % se encuentra sin metabolizar. Hay ensayos que demuestran, que el proceso metabólico puede inducirse en animales expuestos crónicamente a estos residuos. **Honey y col., 2000**, verificaron que los microsomas hepáticos de patos de áreas contaminadas, producen una mayor proporción de benzo dihidrodioles que los microsomas de hígado de pato en zonas no contaminadas, por lo que se convertiría una mayor proporción de B[a]P a 3-OH-B[a]P (aumento entre el 40 y 60% del total de metabolitos). En nuestro estudio, son los caballos los que metabolizan más activamente el B[a]P, quizás debido a que viven más en contacto con la contaminación medioambiental que las vacas.

No es fácil concluir si los niveles de estos residuos encontrados en las excretas son muy relevantes, ya que no hay límites máximos establecidos por la legislación. En el caso del hombre, se toma, como valor de referencia para la presencia de 1-OH-P en orina, 2 µg/g creatinina [**Mastandrea y col., 2005**]. En el presente estudio, al desconocer los niveles de creatinina, no fue posible expresar los resultados en estas unidades. Lo que sí se puede concluir es que, en caso de que estas excretas se quisiesen emplear como abonos orgánicos, no contribuirían significativamente a la contaminación de los suelos. En nuestro país no existen normas con respecto a los límites máximos permisibles de hidrocarburos aromáticos en suelos. Si se toman como referencia los niveles establecidos en otros países como Canadá o los Países Bajos (**Tabla 5**), se observa que las concentraciones de PAHs en las muestras de estiércol, distan mucho de los valores permitidos por estos países en suelos agrícolas.

---

**Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S. ,1997.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

**Hecht, S.S., 2002.** Carcinogenesis, 23, 907-922.

**Van Schooten, F.J.; Moonen, E.J.C.; Van der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J.C.S. ,1997.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33, 317-322.

**Honey, S.; O'Keefe, P.; Drahushuk, A.T.; Olson, J.R.; Kumar, S.; Sikka, H.C., 2000.** Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology 126 (3), 285-292.

**Mastandrea, C.; Chichizola, C.; Ludueña, B.; Sánchez, H.; Álvarez, H.; Guitiérrez, A., 2005.** Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 39, 27-36.

**Tabla 5.** Límites legales permisibles para PAHs (mg/Kg) en suelos de Canadá y los Países Bajos.

Fuente	PAHs	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3
Canadá	B[a]A	0,10	1,0	10
	B[b]F	0,10	1,0	10
	B[k]F	0,10	1,0	10
	B[a]P	0,10	1,0	10
	DB[a,h]P	0,10	1,0	10
	I[1,2,3-cd]P	0,10	1,0	10
Países Bajos	F		10	
	B[a]A		5,0	
	B[k]F		5,0	
	B[a]P		1,0	
	B[ghi]P		5,0	
	I[1,2,3-cd]P		10	

Suelo 1: uso agrícola. Suelo 2: uso recreativo. Suelo 3: uso industrial





## Capítulo V

---



## Determinación de PAHs en moluscos bivalvos

Los PAHs se encuentran en el ambiente marino costero como consecuencia de una serie de procesos: deposición de emisiones de combustiones naturales o antropogénicas, vertidos de desechos industriales o aguas residuales, derrames de combustibles fósiles o sus derivados, incendios de buques petroleros, etc. **[Gevao y col., 1998; Perugini y col., 2007]**. Una vez en el medio marino, los PAHs se distribuyen entre la columna de agua y los sedimentos, dependiendo de factores tales como, las corrientes y el movimiento del agua, que a su vez está condicionado por la época del año, la naturaleza de los sedimentos o las propiedades fisicoquímicas de los compuestos. Teniendo en cuenta el carácter lipofílico de los PAHs, especialmente los de elevado peso molecular, estos compuestos tienden a asociarse a las partículas. Por ello, los sedimentos son el depósito más importante de PAHs en el ambiente marino **[King y col., 2004; Bihari y col., 2007]**.

La cadena alimentaria constituye la principal fuente de exposición de los organismos marinos a los PAHs, dependiendo del grado de acumulación, de su proximidad a la fuente de contaminación, de la biodisponibilidad de los compuestos, del ciclo vegetativo del organismo y de la capacidad de la especie para metabolizarlos **[Guinan y col., 2001]**. Los moluscos bivalvos son excelentes indicadores de contaminación por PAHs en el medio marino, debido a su capacidad para acumular estos compuestos y a su baja actividad metabólica **[Oros y col., 2006]**. De todos los bivalvos, los mejillones resultan especialmente interesantes para tal fin, gracias, además, que viven adheridos a sustratos sin posibilidad de desplazamiento.

El aire, el agua y los alimentos, constituyen las principales vías de exposición del hombre a los PAHs, contribuyendo estos últimos en un 99% **[European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002]**. En la dieta española, según un estudio realizado por **Ibáñez y col., 2005**, los pescados y mariscos contribuyen en un 6,1 % a la ingesta total de PAHs y en un 6,3% a la ingesta

---

**Gevao, B.; Jones, K.C.; Hamilton-Taylor, J., 1998.** Science of the Total Environment, 215, 231–242.

**Perugini, M.; Visciano, P.; Manera, M.; Turno, G.; Lucisano, A.; Amorena, M., 2007.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (5), 2049-2054.

**King, A.J.; Redman J.W.; Zhou, J.L., 2004.** Marine Pollution Bulletin, 48, 229–239.

**Bihari, N.; Fafandel, M.; Piskur, V., 2007.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 52(3), 379-387.

**Guinan, J.; Charlesworth, M.; Service, M.; Oliver, T., 2001.** Marine Pollution Bulletin, 42,1073–1081.

**Oros, D.R.; Ross, J.R.M., 2006.** Marine Environmental Research 60 (4), 466-488.

**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002.** Opinion of the science committee on food on the risk to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons-occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

**Ibáñez, R.; Agudo, A.; Berenguer, A.; Jakszyn, P.; Tormo, M.J.; Sánchez, M.J.; Quirós, J.R.; Pera, G.; Navarro, C.; Martínez, C.; Larrañaga, N.; Dorronsoro, M.; Chirlaque, M.D.; Barricarte, A.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; González, C.A., 2005.** Journal of Food Protection, 68, 2190-2195.

particular de B[a]P. En la población gallega esta contribución podría ser superior, ya que el consumo de pescados y mariscos en Galicia, es más elevado que en otras comunidades autónomas.

Galicia es una potencia acuícola a nivel mundial donde juega un importante papel la industria mejillonera, es la primera productora nacional de mejillón; y a nivel mundial, la tercera después de China y Tailandia. El valor en ventas del sector marisquero gallego, sube año tras año, siendo las especies que más importancia económica tienen el mejillón, la almeja y el berberecho, y de menor importancia económica pero de gran tradición, es la navaja. Las costas gallegas soportan un intenso tráfico marítimo y han sufrido numerosos accidentes petroleros desde los años 50. En 1992, tras el vertido provocado por el buque petrolero “Mar Egeo”, los niveles de PAHs se incrementaron hasta alcanzar concentraciones alarmantes en todos los organismos acuáticos de la zona [**Porte y col., 2000**].

En este capítulo se evaluará el contenido de PAHs en diferentes moluscos bivalvos procedentes de las rías gallegas, comercializados en conserva, al natural o en escabeche, comprobando si sus niveles de se adecuaban a los requerimientos establecidos por la legislación europea. Se estudiará además, la capacidad de estos residuos para migrar desde el molusco hacia el líquido de cobertura, agua en el caso de los productos envasados al natural y aceite en los envasados en escabeche.

## 1. MUESTREO

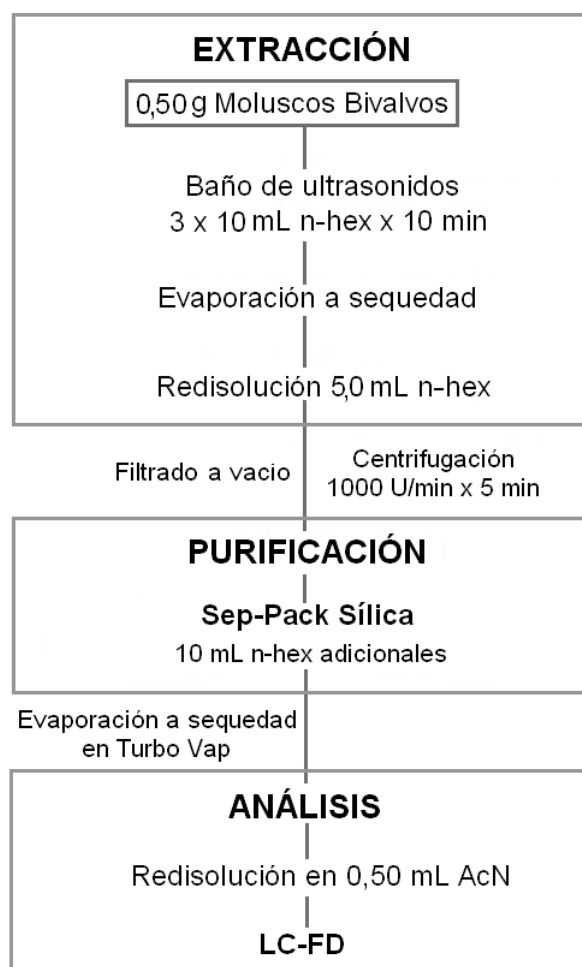
Se analizaron 20 muestras de diferentes moluscos bivalvos comercializados en conserva, al natural (mejillones, berberechos, almejas, y navajas) y en escabeche (mejillones). En diferentes establecimientos se adquirieron cuatro marcas de cada producto, haciéndose referencia en el etiquetado de todos ellos, a su producción en las rías gallegas. Una vez abiertas las latas, se separaron los moluscos del líquido de cobertura, agua y sal en los productos al natural, y aceite vegetal, vinagre, especias y sal, en los mejillones en escabeche. Después de liofilizados y homogenizados, los moluscos se analizaron por duplicado, siguiendo el protocolo reflejado en la **Figura 1**. Para procesar los líquidos de cobertura, aceite y agua, se emplearon los métodos mostrados en las **Figuras 2 y 3**. En la **Tabla 1** se recogen algunas de las características más relevantes, de cada una de las especies de bivalvos analizados.

**Tabla 1.** Información nutricional (por 100g de producto) y algunas de las características más relevantes de los moluscos analizados.

Molusco	Nombre científico	Información nutricional				%Humedad	Muestras	Información relevante
		Proteínas	Hidratos	Lípidos				
Mejillón	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10	1,9	1,9		72	M1,M2,M3,M4 (al natural) Me1,Me2,Me3,Me4 (en escabeche)	--
Berberecho	<i>Cerastoderma edule</i>	11	0,50	0,50		90	B1, B2, B3, B4	--
Almeja	<i>Venerupis pullastra</i>	11	0,10	0,30		95	A1, A2, A3, A4	A1 y A2 recogidas en las Rias de Arousa y Muros. A1 recolectada en otoño
Navaja	<i>Ensis Ensis</i>	11	0,50	0,50		90	N1, N2, N3, N4	N2 recogida en O Grove y Pobra do Caramiñal (Ría de Arousa)

## 2. DETERMINACIÓN DE PAHs

Se determinaron 12 PAHs (P, B[a]A, Chr, 5-MChr, B[j]F, B[b]F, B[k]FA, B[a]P, DB[ah]A, DB[a]P, B[ghi]P, I[1,2,3-cd]P), 11 de ellos reconocidos por la Unión Europea como posibles cancerígenos. El protocolo seguido (**Figura 1**), es el mismo que se empleó para el procesamiento de las muestras de leche en polvo.



**Figura 1.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de bivalvos.

Para evaluar la precisión (% RSD) del método, se analizaron por triplicado dos muestras de moluscos, una con elevada carga contaminante (Me2) y otra con niveles de PAHs mucho menores (A1). Los %RSD obtenidos en la primera muestra oscilaron entre el 3,5 y el 5,0%; en el caso de la almeja, entre el 3,6 y el 6,5%

El % de recuperación (%R) se estimó comprobando el remanente de PAHs que permanecen en el molusco, después de ser sometido al procedimiento analítico seleccionado. Para ello, el residuo obtenido después de

procesar una muestra, se reextrae con 10 mL de n-hexano, determinando los niveles de PAHs en este extracto. El porcentaje de PAHs remanente osciló entre el 4 y el 6% para el P y B[a]P, respectivamente.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se recogen en la **Tabla 2**, comprobando que el LC encontrado para el B[a]P, es muy inferior al límite máximo requerido por la legislación en este tipo de alimentos (10 µg/Kg).

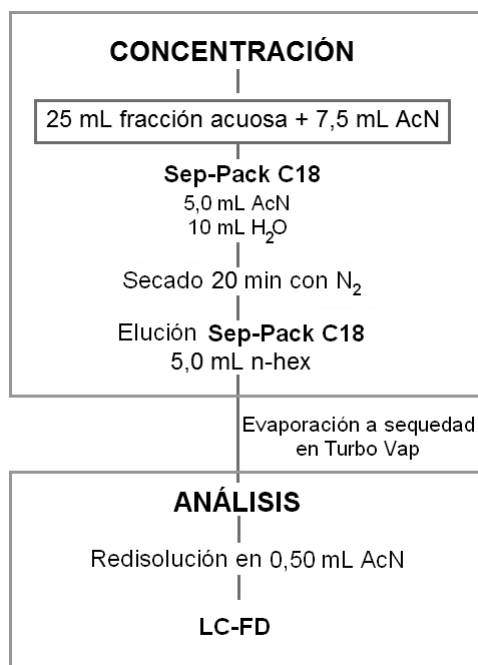
**Tabla 2.** Límites de detección y de cuantificación para cada uno de los PAHs en moluscos bivalvos (µg/Kg p.h., n=6).

PAHs	LD	LC
P	0,030	0,10
B[a]A	0,0040	0,010
Chr	0,025	0,075
5-MChr	0,013	0,035
B[j]F	0,065	0,17
B[b]F	0,0090	0,025
B[k]F	0,0010	0,0030
B[a]P	0,0030	0,0080
DB[a,l]P	0,17	0,050
DB[a,h]A	0,0090	0,032
B[ghi]P	0,070	0,17
I[1,2,3-cd]P	0,034	0,10

Los métodos empleados para analizar los líquidos de cobertura (**Figuras 2 y 3**) fueron los optimizados y validados por **Vázquez-Troche y col., 2000**, y **García-Falcón y col., 2004**.



**Figura 2.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en la fracción lipídica del líquido de cobertura [Vázquez-Troche y col., 2000].



**Figura 3.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en la fracción acuosa del líquido de cobertura [García-Falcón y col., 2004].



### 3. NIVELES DE PAHs EN MOLUSCOS BIVALVOS

En todas las muestras analizadas se ha encontrado P, B[b]F, B[k]F, B[a]P y B[ghi]P. En una muestra de mejillón (M1) y en dos de berberechos (B2 y B3) se ha cuantificado además, I[1,2,3-cd]P (**Tabla 3 y Figura 4**). De todos los PAHs analizados, el P es el que ha presentado mayores concentraciones en casi todas las muestras, especialmente en las de mejillón, en las que el analito supone entre el 62 y el 86 % del total en mejillones al natural y entre el 81 y el 98% en mejillones en escabeche. La concentración de B[a]P osciló entre 0,010 (muestra A3) y 1,4 µg/Kg p.h. (peso húmedo) (muestra N4), no sobrepasando ninguna de las muestras el límite establecido por la legislación (10µg/Kg p.h.) [**Reglamento 1881/2006**]. Estos resultados ponen de manifiesto la mejora de la calidad de las aguas de las costas gallegas, tras las últimas catástrofes marítimas (Mar Egeo y Prestige). **Nieto y col., 2006**, estudiaron los niveles de PAHs en mejillones recogidos en las rías de Arousa y Muros, tres días después del hundimiento del Prestige, comprobando que las concentraciones de PAHs eran realmente alarmantes, oscilando entre 2,5 y 5,9 mg/kg de peso seco. **Porte y col., 2000**, determinaron PAHs en mejillones, almejas y berberechos recogidos a los 3, 6, 9, 12 y 34 meses del incendio del petrolero “Mar Egeo” en la costa de A Coruña en 1992. Tomaron muestras entre Camariñas y Ferrol. El objetivo de este trabajo fue conocer en profundidad el efecto del petróleo sobre los bivalvos y evaluar los procesos naturales de limpieza del medio marino. Estos autores comprobaron como a los 3 años del accidente, las concentraciones de PAHs habían disminuido considerablemente. Los niveles máximos encontrados transcurrido este tiempo, fueron de 537 µg/Kg p.s (pso seco)y 534 µg/Kg p.s para mejillones y almejas respectivamente, presentando los berberechos niveles inapreciables. Aún así, estos valores son muy superiores a los cuantificados en el presente estudio. En la **Tabla 4** se recogen los rangos de concentraciones encontrados por diversos autores, en moluscos producidos en áreas industriales, altamente urbanizadas o con una importante actividad comercial. Nuevamente, los resultados obtenidos en nuestro estudio, son muy inferiores a los encontrados por estos autores.

---

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

**Nieto, O.; Aboigor, J.; Buján, R.; N'Diaye, M.; Graña, J.; Saco-Álvarez, L.; Franco, A.; Soriano, J.A.; Beiras, R., 2006.** Marine Ecology Progress Series, 328, 41-49.

**Porte, C.; Biosca, X.; Pastor, D.; Solé, M.; Albaigés, J., 2000.** Environmental Science and Technology, 34, 5067-5075.

**Tabla 3.** Niveles de PAHs encontrados en las muestras de bivalvos ( $\mu\text{g/Kg p.h.} \pm \text{s.d.}$ ,  $n=2$ ) y factores de toxicidad equivalente.

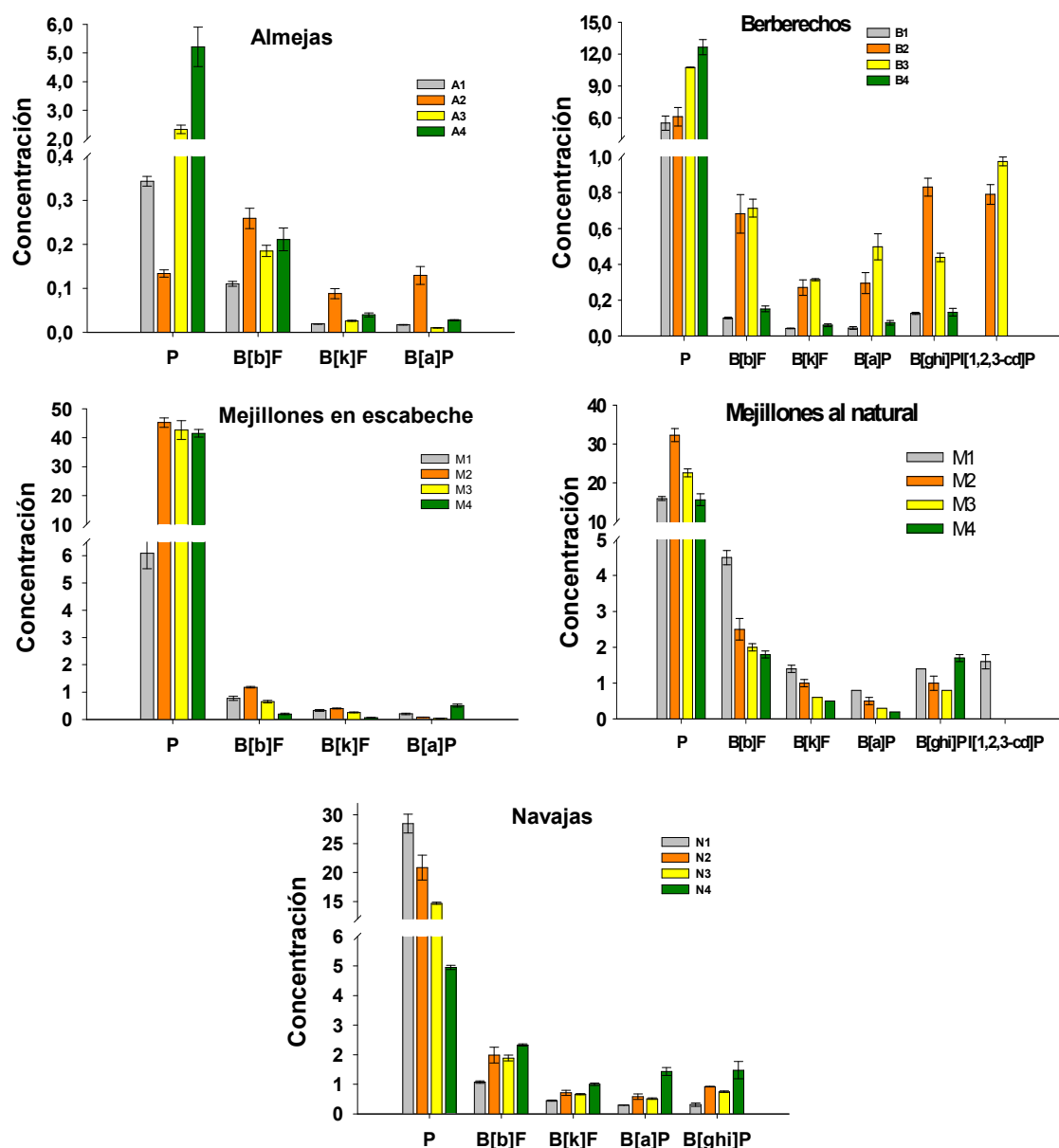
PAHs	Almejas				Berberechos			
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
P	0,34 $\pm$ 0,011	0,13 $\pm$ 0,0082	2,3 $\pm$ 0,15	5,2 $\pm$ 0,69	5,5 $\pm$ 0,67	6,1 $\pm$ 0,87	11 $\pm$ 0,022	12 $\pm$ 0,72
B[ <i>l</i> ]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[ <i>b</i> ]P	0,10 $\pm$ 0,0056	0,26 $\pm$ 0,023	0,18 $\pm$ 0,013	0,21 $\pm$ 0,026	0,10 $\pm$ 0,0040	0,68 $\pm$ 0,11	0,71 $\pm$ 0,050	0,15 $\pm$ 0,016
B[ <i>k</i> ]P	0,019 $\pm$ 0,0010	0,090 $\pm$ 0,011	0,026 $\pm$ 0,0010	0,040 $\pm$ 0,0044	0,042 $\pm$ 0,0010	0,27 $\pm$ 0,043	0,31 $\pm$ 0,0060	0,061 $\pm$ 0,0081
B[ <i>a</i> ]P	0,017 $\pm$ 0,0010	0,13 $\pm$ 0,020	0,010 $\pm$ 0,0010	0,027 $\pm$ 0,0013	0,045 $\pm$ 0,0070	0,29 $\pm$ 0,060	0,50 $\pm$ 0,072	0,074 $\pm$ 0,013
DB[ <i>a</i> , <i>l</i> ]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DB[ <i>a</i> , <i>h</i> ]A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[ <i>ghi</i> ]P	nc	nc	nc	nc	nc	0,83 $\pm$ 0,050	0,44 $\pm$ 0,023	nc
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	nd	nd	nd	nd	nd	0,80 $\pm$ 0,055	0,97 $\pm$ 0,024	nd
$\Sigma$ PAHs	0,48	0,61	2,5	5,5	5,7	9,0	14	13
$\bar{X}$ $\Sigma$ PAHs	2,3 $\pm$ 2,3				10 $\pm$ 3,8			
$\Sigma$ FTE	0,030	0,17	0,034	0,058	0,070	0,48	0,71	0,11
$\bar{X}$ $\Sigma$ FTE	0,072				0,34			

**Tabla 3 (continuación).** Niveles de PAHs encontrados en las muestras de bivalvos ( $\mu\text{g/Kg p.h.} \pm \text{s.d., } n=2$ ) y factores de toxicidad equivalente.

PAHs	Mejillones							
	M1	M2	M3	M4	Me1	Me2	Me3	Me4
P	16 ± 0,49	32 ± 1,7	22 ± 1,02	16 ± 1,5	6,0 ± 0,60	45 ± 1,6	43 ± 3,3	41 ± 1,3
B[ <i>j</i> ]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[ <i>b</i> ]P	4,5 ± 0,21	2,5 ± 0,28	2,0 ± 0,060	1,8 ± 0,11	0,80 ± 0,10	1,2 ± 0,028	0,70 ± 0,047	0,25 ± 0,025
B[ <i>k</i> ]P	1,4 ± 0,10	1,0 ± 0,070	0,64 ± 0,013	0,54 ± 0,025	0,33 ± 0,040	0,40 ± 0,013	0,30 ± 0,018	0,10 ± 0,080
B[ <i>a</i> ]P	0,81 ± 0,013	0,49 ± 0,10	0,28 ± 0,042	0,19 ± 0,030	0,20 ± 0,030	0,10 ± 0,0040	0,040 ± 0,0040	0,50 ± 0,056
DB[ <i>a,h</i> ]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DB[ <i>a,h</i> ]A	nd	nd	nd	nd	nd	nc	nd	nd
B[ <i>ghi</i> ]P	1,4 ± 0,019	1,04 ± 0,20	0,80 ± 0,044	1,7 ± 0,10	nc	nc	nc	nc
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	1,6 ± 0,23	nc	nd	nd	nd	nd	nd	nd
$\Sigma$ PAHs	26	37	26	20	7,4	47	44	42
$\bar{X} \Sigma$ PAHs	27 + 7,3      35 + 18							
$\Sigma$ FTE	1,4	0,87	0,57	0,46	0,32	0,48	0,17	0,57
$\bar{X} \Sigma$ FTE	0,82      0,33							

**Tabla 3 (continuación).** Niveles de PAHs encontrados en las muestras de bivalvos ( $\mu\text{g/Kg}$  p.h.  $\pm$  s.d.,  $n=2$ ) y factores de toxicidad equivalente.

PAHs	Navajas			
	N1	N2	N3	N4
P	$28 \pm 1,6$	$21 \pm 2,2$	$15 \pm 0,19$	$4,9 \pm 0,070$
B[ <i>i</i> ]P	nd	nd	nd	nd
B[ <i>b</i> ]P	$1,1 \pm 0,043$	$2,0 \pm 0,27$	$1,9 \pm 0,10$	$2,3 \pm 0,036$
B[ <i>k</i> ]P	$0,44 \pm 0,021$	$0,71 \pm 0,086$	$0,66 \pm 0,019$	$1,0 \pm 0,040$
B[ <i>a</i> ]P	$0,30 \pm 0,0063$	$0,58 \pm 0,094$	$0,51 \pm 0,022$	$1,4 \pm 0,13$
DB[ <i>a,h</i> ]P	nd	nd	nd	nd
DB[ <i>a,h</i> ]A	nd	nd	nd	nd
B[ <i>ghi</i> ]P	$0,28 \pm 0,060$	$0,91 \pm 0,011$	$0,75 \pm 0,024$	$1,5 \pm 0,29$
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	nd	nd	nd	nd
$\Sigma$ PAHs	31	25	19	11
$\bar{X} \Sigma$ PAHs	$21 \pm 8,5$			
$\Sigma$ FTE	0,48	0,88	0,79	1,8
$\bar{X} \Sigma$ FTE	1,0			



**Figura 4.** Concentraciones en ( $\mu\text{g/kg p.h.}$ ) de PAHs en las muestras de moluscos bivalvos analizadas.

**Tabla 4.** PAHs totales encontrados por diversos autores en mejillones y almejas ( $\mu\text{g/Kg}$ ).

Bivalvos	Área	Rango de concentraciones	Referencia
Mejillones	Golfo de Rikeja, Croacia	49-134 (p.h.)	<i>Bihari y col., 2007</i>
	Golfo de Nápoles	78-175 (p.h.)	<i>Perugini y col., 2007</i>
	Kiel (Alemania)- Peenemünde (Polonia), Mar Báltico	92-361 (p.s.)	<i>Baumard y col., 1999</i>
	Laguna de Venecia	126-527 (p.s.)	<i>Nesto y col., 2007</i>
	Bahía Arcachon, NO Francia	279-2420 (p.s.)	<i>Baumard y col., 1999</i>
	Rías gallegas	71-135 (p.s.) 20-37 (p.h.)	<i>Presente estudio</i>
	Ravenna, Italia	99-130 (p.s.)	<i>Vassura y col., 2005</i>
Almejas	Bahía de San Franciasco	78-720 (p.s.)	<i>Oros y Ross, 2005</i>
	Mar Báltico	44-298 (p.h.)	<i>Pikkarainen, 2004</i>
	Rías gallegas	9,6-110(p.s.) 0,48-5,5 (p.h.)	<i>Presente estudio</i>

Como se observa en la **Figura 5**, en general, los berberechos y las almejas tienen menores niveles totales de PAHs que el resto de los moluscos analizados. Además del contenido de PAHs, también se han calculado los factores de toxicidad equivalente (FTE) para cada una de las muestras (**Tabla 4**). Las navajas, aunque no son los moluscos con mayor carga de PAHs, sí son las que presentan una mayor toxicidad, con un valor medio de FTE de 1,0. Es difícil establecer las causas y las diferencias en los niveles de contaminación de estos moluscos, ya que se desconocen los principales factores que contribuyen a la bioacumulación de PAHs: el grado de contaminación de las zonas de captura, la etapa del ciclo vegetativo o la época del año en la que fueron recolectados.

**Bihari, N.; Fafandel, M.; Piskur, V., 2007.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 52(3), 379-387.

**Perugini, M.; Visciano, P.; Manera, M.; Turno, G.; Lucisano, A.; Amorena, M., 2007.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (5), 2049-2054.

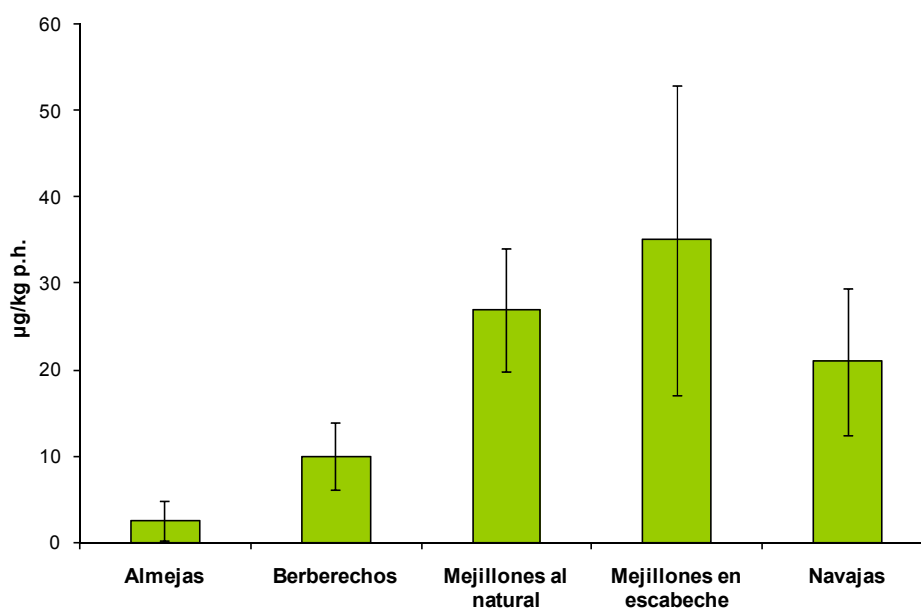
**Baumard, P.; Budzinski, H.; Garrigues, P.; Narbonne, J.F.; Burgeot, T.; Michel, X.; Bellocq, J., 1999.** Marine Environmental Research 47 (5), 415-439.

**Nesto, N.; Romano, S.; Moschion, V.; Mauri, M.; Da Ros, L., 2007.** Marine Pollution Bulletin, 55, 469-484.

**Vassura, I.; Foschini, F.; Baravelli, V.; Fabbri, D., 2005.** Chemistry and Ecology, 21 (6), 415-424.

**Oros, D.R.; Ross, J.R.M., 2006.** Marine Environmental Research 60 (4), 466-488.

**Pikkarainen, A.L., 2004.** Polycyclic Aromatic Compounds 24 (4-5), 681-695.



**Figura 5.** Promedio de PAHs totales para las diferentes muestras de moluscos bivalvos (µg/kg p.h.).

La influencia de la época de recolección o del grado de contaminación de la zona de captura ha sido documentada en otros estudios. **Perugini y col., 2007**, determinaron PAHs en mejillones del Golfo de Nápoles recogidos en los meses de julio y diciembre. Estos autores observaron que el 71% de los mejillones capturados en invierno excedían el límite máximo residual de B[a]P establecido por la legislación [**Reglamento 208/2005**], mientras que las muestras recogidas en verano presentaban concentraciones inferiores a este valor. Este fenómeno lo achacan a la dirección de las corrientes y a las tormentas marinas que tienen lugar durante el invierno, las cuales aumentan la turbidez de las aguas y por lo tanto, la cantidad de partículas en suspensión y su posterior acumulación en los mejillones.

De igual manera, **Nesto y col., 2007**, encontraron diferencias significativas entre las cargas de PAHs en mejillones recogidos en diferentes estaciones del año. Este fenómeno también fue comprobado por **Menon y Menon., 1999**, en un experimento hecho en el laboratorio, en el que simulaban diferentes situaciones ambientales durante el cultivo de almejas, empleando sedimentos contaminados. Estos autores observaron que la acumulación de PAHs en las almejas, fue mayor cuando los sedimentos se mantenían continuamente en suspensión (21 mg/g de p.h.), que cuando los sedimentos no

**Perugini, M.; Visciano, P.; Manera, M.; Turno, G.; Lucisano, A.; Amorena, M., 2007.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (5), 2049-2054.

**Reglamento (CE) 208/2005** de la Comisión, de 4 de febrero de 2005, por el que se modifica el Reglamento 466/2001 en lo relativo a los PAHs.

**Nesto, N.; Romano, S.; Moschion, V.; Mauri, M.; Da Ros, L., 2007.** Marine Pollution Bulletin, 55, 469-484.

**Menon, N.N.; Menon, N.R., 1999.** Aquatic Toxicology, 45, 63-69.

se removían (13 mg/g p.h.). Esto es debido a que en el primero de los casos, aumenta el nivel de PAHs en el agua circundante.

Estas diferencias podrían atribuirse a diferencias en el contenido lipídico de los productos, [**Porte y col., 2000**]. El mejillón es, de las cuatro, la especie más rica en grasas, con 1,9 g de lípidos por cada 100g de producto. Por el contrario, la almeja es el molusco más pobre en este principio inmediato con valores que oscilan entre 0,30 y 0,90 g por cada 100g de producto. También podría influir el hecho de que los mejillones son los únicos bivalvos estudiados que no pueden desplazarse, de manera que aunque las condiciones sean adversas no pueden abandonar el lugar.

La zona de elución del B[a]A, Chr y 5-MChr está muy interferida lo que imposibilitó su cuantificación.

Se ha observado que, en general, los mejillones en escabeche contienen menores niveles de PAHs de elevado peso molecular (con 5 y 6 anillos) que los enlatados al natural ( $1,2 \pm 0,40$  vs  $6,0 \pm 2,8$ ). Los PAHs con pesos moleculares superiores a 252 g/mol (B[b]F, B[a]P, B[k]F, B[ghi]P e I[1,2,3-cd]P) presentan coeficientes de partición octanol/agua muy superiores a los de menor peso molecular, lo que les confiere a los primeros, un mayor carácter lipídico. Estas propiedades fisicoquímicas llevaron a pensar, en la posible migración de los PAHs con 5 y 6 aromáticos hacia el aceite de cobertura, en aquellos mejillones envasados en escabeche. Para verificar esta hipótesis, se analizaron la fracción acuosa y oleosa de los líquidos de cobertura. Como era de esperar, y debido al carácter lipofílico de los PAHs, en la primera fracción no se han detectado PAHs; en cambio en el aceite, se encontraron los mismos compuestos que en los mejillones y en niveles bastante elevados (**Tabla 5**). Aún así, no se supera el nivel máximo legal establecido para el B[a]P en aceites vegetales (2 µg/Kg) [**Reglamento comunitario 1881/2006**]. Aunque es difícil dar resultados concluyentes, ya que se desconoce el nivel de PAHs tanto en los mejillones como en los aceites antes de su enlatado, se podría argumentar que los PAHs de alto peso molecular tienen tendencia a difundir desde los mejillones hacia la fracción oleosa del líquido de cobertura. Un fenómeno semejante a este fue encontrado por **Vázquez-Troche y col., 2000**, al analizar aceites de cobertura procedentes de pescados enlatados. Estos autores comprobaron que los niveles de PAHs eran superiores, en aquellos aceites que contenían pescados ahumados, argumentando que los residuos podían proceder de la migración desde el producto. Tras estos análisis

---

**Porte, C.; Biosca, X.; Pastor, D.; Solé, M.; Albaigés, J., 2000.** Environmental Science and Technology, 34, 5067-5075.

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

**Vázquez-Troche, S.; García-Falcón, M.S.; González-Amigo, S.; Lage-Yusty, M.A.; Simal-Lozano, J., 2000.** Talanta 51 (6), 1069-1076.



preliminares y gracias a la colaboración de una industria conservera gallega, en la actualidad se está estudiando en mayor profundidad este comportamiento. La empresa nos ha proporcionado las materias primas para la elaboración de mejillones en escabeche, así como el producto final enlatado.

**Tabla 5.** Niveles de PAHs encontrados en la fracción lipídica del líquido de cobertura de las muestras de mejillones en escabeche ( $\mu\text{g/L}$  p.h.  $n=2$ ) y factores de toxicidad equivalente.

PAHs	Aceites			
	A1	A2	A3	A4
<b>P</b>	<b>9,2 <math>\pm</math> 0,050</b>	<b>7,8 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>3,7 <math>\pm</math> 0,074</b>	<b>11 <math>\pm</math> 0,012</b>
<b>B[<i>l</i>]P</b>	nd	nd	nd	nd
<b>B[<i>b</i>]P</b>	<b>4,1 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>1,7 <math>\pm</math> 0,050</b>	<b>2,4 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>3,0 <math>\pm</math> 0,14</b>
<b>B[<i>k</i>]P</b>	<b>1,2 <math>\pm</math> 0,060</b>	<b>0,70 <math>\pm</math> 0,020</b>	<b>1,0 <math>\pm</math> 0,010</b>	<b>1,2 <math>\pm</math> 0,010</b>
<b>B[<i>a</i>]P</b>	<b>0,80 <math>\pm</math> 0,040</b>	<b>0,60 <math>\pm</math> 0,010</b>	<b>1,0 <math>\pm</math> 0,030</b>	<b>0,90 <math>\pm</math> 0,070</b>
<b>DB[<i>a, l</i>]P</b>	nd	nd	nd	nd
<b>DB[<i>a, h</i>]A</b>	nd	nd	nd	nd
<b>B[<i>ghi</i>]P</b>	nd	nd	nd	nd
<b>I[1,2,3-<i>cd</i>]P</b>	nd	nd	nd	nd
<b><math>\Sigma</math>PAHs</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>16</b>
<b><math>\bar{X}\Sigma</math>PAHs</b>	<b>13 <math>\pm</math> 2,8</b>			
<b><math>\Sigma</math>FTE</b>	<b>1,3</b>	<b>0,80</b>	<b>0,80</b>	<b>1,3</b>
<b><math>\bar{X}\Sigma</math>FTE</b>	<b>1,1</b>			

**Binelli y Provini, 2003**, determinaron diferentes contaminantes persistentes, entre ellos PAHs, en almejas procedentes de diferentes mercados italianos y europeos con el fin de evaluar el riesgo de estos contaminantes e identificar posibles efectos sobre la salud. El rango de concentraciones encontradas fueron superiores a las del presente trabajo, 2,1-24  $\mu\text{g/Kg}$  p.h..

En definitiva, se podría decir que los principales moluscos gallegos comercializados en conserva al natural y los mejillones en escabeche no suponen un riesgo para la salud del consumidor, ya que no exceden el límite máximo legal establecido para el B[*a*]P. Como se ha comentado anteriormente,

los mejillones son organismos centinela por ello se podría decir que gran parte de las rías gallegas presentan un bajo grado de contaminación por PAHs.

## Capítulo VI

---



## Contribución del tostado a la contaminación de alimentos ricos en carbohidratos

En los capítulos anteriores se ha evaluado la presencia de PAHs en el medio ambiente, así como su repercusión sobre la contaminación en origen, de diferentes alimentos de origen animal y vegetal. En este apartado se estudiará como contribuye el procesado de los alimentos, en la carga total de PAHs.

Las dos grandes fuentes responsables de la presencia de PAHs en los alimentos, por causa de las manipulaciones a las que se someten son, el ahumado y los tratamientos térmicos severos. Las repercusiones del ahumado ya han sido estudiadas con gran profundidad, por el grupo de investigación en el que me integro [**García-Falcón y col., 1996, 2005**]. Por ello, en este capítulo se prestará atención a los tratamientos térmicos severos, concretamente al tostado.

De acuerdo con el documento de debate sobre la contaminación por PAHs del Codex Alimentarius [**Codex Alimentarius Comission, 2004**]. Los tratamientos térmicos severos pueden aplicarse a los alimentos de forma indirecta (los humos generados por el agente térmico no entran en contacto directo con el alimento) o directa (sí hay un contacto directo entre los humos de la fuente calefactora y el producto) [**Codex Alimentarius Comission, 2004**]. Un ejemplo de un tratamiento térmico indirecto, sería el cocinado en horno eléctrico, mientras que el cocinado en barbacoa, sería un claro ejemplo de un tratamiento térmico indirecto. La contaminación por PAHs causada por la aplicación de un tratamiento térmico indirecto, se deberá a la pirólisis de los principios inmediatos del alimento. En cambio, en los alimentos procesados mediante tratamientos directos, la contaminación puede deberse, además, a la deposición de PAHs arrastrados por los humos de la combustión. Esta fuente de contaminación dependerá de las condiciones de la combustión (tipo de combustible empleado, temperatura, aireación, intensidad de la llama, cantidad de materia particulada generada, etc.) [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**].

---

García Falcón, M.S.; López de Alda Villaizán, M.J.; González Amigo, S.; Simal Lozano, J.; Lage Yusty, M. A., 1996. Journal of Chromatography, 753, 207-215.

García-Falcón, M.S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J., 2005. Food Chemistry, 90, 643-647.

Codex Alimentarius Commission (CX/FAC05/37/34), October 2004. Joint FAO/WHO food standards programme Codex Committee on food additives and contaminants. Discussion paper on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination.

European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002. Opinion of the science committee on food on the risk to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons-Occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final.

Existe bibliografía abundante, en la que se verifica las repercusiones de los tratamientos térmicos severos, sobre la generación de PAHs en alimentos con elevado contenido en proteínas y grasas [**Fazio y Howard, 1983, Menzie y col., 1992; Mottier y col., 2000 ; Kazerouni y col., 2001**] pero son pocos los artículos referidos alimentos ricos en hidratos de carbono [**Kayali-Sayadi y col., 2000; Nieva-Cano y col., 2001**].

Numerosos estudios revelan que los mayores niveles de PAHs, se encuentran en los alimentos incluidos en el grupo de las grasas y aceites y en el grupo de las carnes sometidas a tratamientos térmicos severos o a ahumado [**European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002**]. En el resto de los alimentos como cereales, vegetales, frutas y hortalizas, etc., las concentraciones de estos residuos son muy inferiores. Sin embargo se observa que, aunque menos contaminados, son los alimentos que entran a formar parte de la dieta en un porcentaje elevado, los que representan una contribución más importante a la ingesta total de PAHs, como es el caso de los cereales [**Guillén y col., 1996**]. En el caso concreto de la población española, el grupo de los cereales contribuye a la ingesta total de B[a]P y PAHs totales, en un 20 y un 40 %, respectivamente [**Ibáñez y col., 2005**].

En este capítulo se evaluará como contribuyen distintas técnicas de tostado (a la brasa, a la llama viva, en tostadora convencional y en horno), a la contaminación de un alimento rico en hidratos de carbono, el pan. Se estudiará además, el contenido de PAHs en diferentes muestras de pan tostado y cereales infantiles de venta y consumo en nuestro país. Estos productos son susceptibles de contaminarse por PAHs, debido a las elevadas temperaturas alcanzadas durante su elaboración, en la etapa de tostado. En el caso particular de los cereales infantiles, y teniendo en cuenta que van destinados a un grupo de riesgo, se limita legalmente la presencia de B[a]P, a 1,0 µg/Kg [**Reglamento comunitario 1881/2006**].

---

**Fazio, T.; Howard, J.W., 1983.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: In: Bjorseth A, ed., Hadbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. New York: Marcel Deeker, 461-505.

**Mottier, P.; Parisod, V.; Turesky, R.J., 2000.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(4), 1160-1166.

**Kazeruoni, N.; Sinha, R., Hsu, C.-H.; Greenberg, A.; Rothman, N., 2001.** Food and Chemical Toxicology I, 39, 423-436.

**Kayali-Sayadi, M.N.; Rubio-Barroso, S.; García-Iranzo, R.; Polo-Díez, L.M., 2000.** Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 23(12), 1913-1925.

**Nieva-Cano, M.J.; Rubio-Barroso, S.; Santos-Delgado, M.J., 2001.** Analyst, 126, 1326-1331.

**Guillén, M.D.; Sopelana, P; Cid, C.; Partearroyo, M.A., 1996.** Alimentaria, 41-47.

**Ibáñez, R.; Agudo, A.; Berenguer, A.; Jakszyn, P.; Tormo, M.J.; Sánchez, M.J.; Quirós, J.R.; Pera, G.; Navarro, C.; Martínez, C.; Larrañaga, N.; Dorronsoro, M.; Chirlaque, M.D.; Barricarte, A.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; González, C.A., 2005.** Journal of Food Protection, 68, 2190-2195.

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

## 1. MUESTREO

### 1.1. MUESTRAS DE PAN TOSTADO

Se han analizado dos tipos de muestras de pan, unas obtenidas a nivel industrial y adquiridas en el mercado, y otras elaboradas en el laboratorio empleando diferentes técnicas de tostado.

#### 1.1.1. Pan tostado comercial

Se hizo un estudio de mercado, adquiriendo aquellas marcas comerciales de pan tostado, que ofrecen una mayor gama de productos. En total se analizaron 24 muestras. En la Tabla 2 del anexo se recogen los ingredientes principales de las mismas, así como sus características más relevantes.

#### 1.1.2. Pan tostado en el laboratorio

Para comprobar el efecto de las altas temperaturas sobre la formación de PAHs, se ha sometido una muestra de pan, a distintas técnicas de tostado. La muestra consistió en una rebanada de pan de molde blanco sin corteza, de 28 g de peso y de dimensiones 10 x 10 x 1,2 cm.

##### a. Tostado al horno

Se evaluaron dos tipos de hornos, uno eléctrico y otro que emplea gas ciudad como combustible. Las muestras se sometieron en ambos casos a una temperatura aproximada de 200 °C durante 20 minutos. Con estas condiciones se consigue un tostado medio del pan. Para comprobar si la pérdida del control de la temperatura afectaría a la síntesis de PAHs, se calcinaron dos rebanadas de pan exponiéndolas, durante quince minutos, a 300, 500 y 700 °C respectivamente. Estas muestras se elaboraron en una mufla, ya que el horno doméstico no llegaba a alcanzar temperaturas tan elevadas (**Figura 1**).

##### b. Tostado en tostadora eléctrica

Se ha empleado una tostadora eléctrica tradicional de 850 W. Las condiciones de tostado fueron 270 °C durante 4 minutos (**Figura 1**).

##### c. Tostado a la brasa

Las brasas se obtuvieron de diferentes materiales: carbón vegetal y madera de roble. Para iniciar la combustión del carbón, fue necesario calentarlo en una mufla a 300 °C hasta que la mayor parte estuvo incandescente. El pan

se tostó a una distancia de 6 cm sobre las brasas, durante el tiempo necesario para obtener un tostado medio/alto (5 minutos) (**Figura 1**).

La madera de roble, previamente triturada, se quemó con ayuda de una placa eléctrica (450 °C) sin producir llama. Una vez comenzada la combustión, el pan se mantuvo a una altura de 6 cm sobre las brasas hasta alcanzar un grado de tostado semejante al anterior (9 minutos) (**Figura 1**).

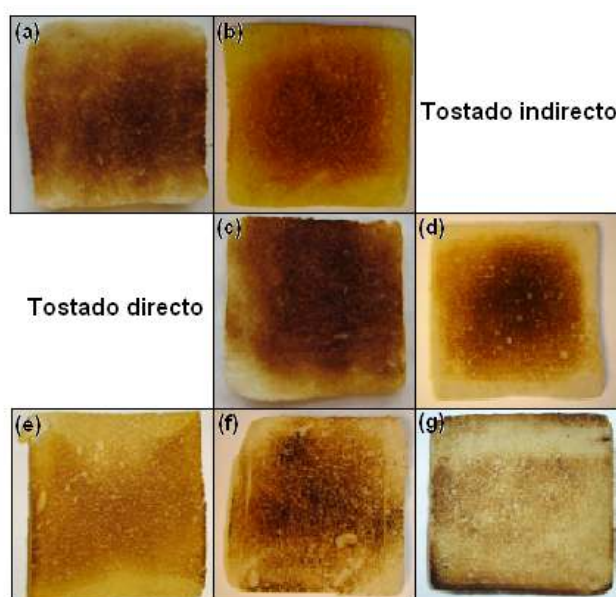
En ambos casos se empleó una parrilla que permitía el contacto directo del alimento con los productos de combustión (**Figura 1**).

d. Tostado a la llama viva

Se tostó el pan directamente sobre la llama generada por dos combustibles diferentes: madera de roble y gas ciudad. Para obtener un tostado medio/alto, fue necesario mantener el pan a unos 20 cm sobre el fuego durante 15 minutos en el caso de la hoguera, y a unos 6 cm durante 10 minutos en el del gas (**Figura 1**). En este último también se usó una parrilla semejante a la descrita anteriormente (**Figura 1**). Para comprobar si son las emisiones de humo y sus partículas las que más contribuyen a la contaminación por PAHs, también se procesó una muestra de pan, limitando el contacto con las emisiones. Para ello, una rebanada se tostó envuelta en papel de aluminio y otra en una sartén. Las condiciones son las mismas que las empleadas en el caso anterior.

Las técnicas de tostado empleadas, se pueden clasificar en directas e indirectas. Las primeras serían aquellas que permiten el contacto directo del alimento con los humos emitidos por el combustible, como son el tostado en horno de gas doméstico, el tostado a la brasa y el tostado a la llama viva. El indirecto incluiría aquellos procedimientos en los que no se liberan productos de combustión o no se permite su deposición sobre el alimento, como es el caso del tostado al horno eléctrico o mediante tostadora convencional. En la **Tabla 1**, se resumen las condiciones empleadas en cada caso.





**Figura 1.** Pan tostado mediante diferentes técnicas: (a) horno eléctrico a 200°C, (b) tostadora, (c) horno de gas, (d) brasa de carbón, (e) brasa de roble, (f) llama de gas, (g) llama de roble.

**Tabla 1.** Técnicas de tostado y condiciones empleadas

TOSTADO INDIRECTO					TOSTADO DIRECTO				
Condiciones	Horno Eléctrico	Mufia		Tostadora	Horno gas	Brasa			Llama
	200 °C	300 °C	500 °C	Carbón		Roble	Roble		
t de la fuente (°C)	200	300	500	250 - 270	200	300 - 350	450	700 - 800	450 - 500
t en el pan (°C)	200	300	500	250 - 270	200	190 - 200	140 - 150	100 - 110	300 - 330
Distancia entre el pan y la fuente (cm)	--	--	--	--	--	6,0	6,0	20	6,0
Tiempo de tostado (min)	20	15	15	4,0	15	5,0	9,0	10	10

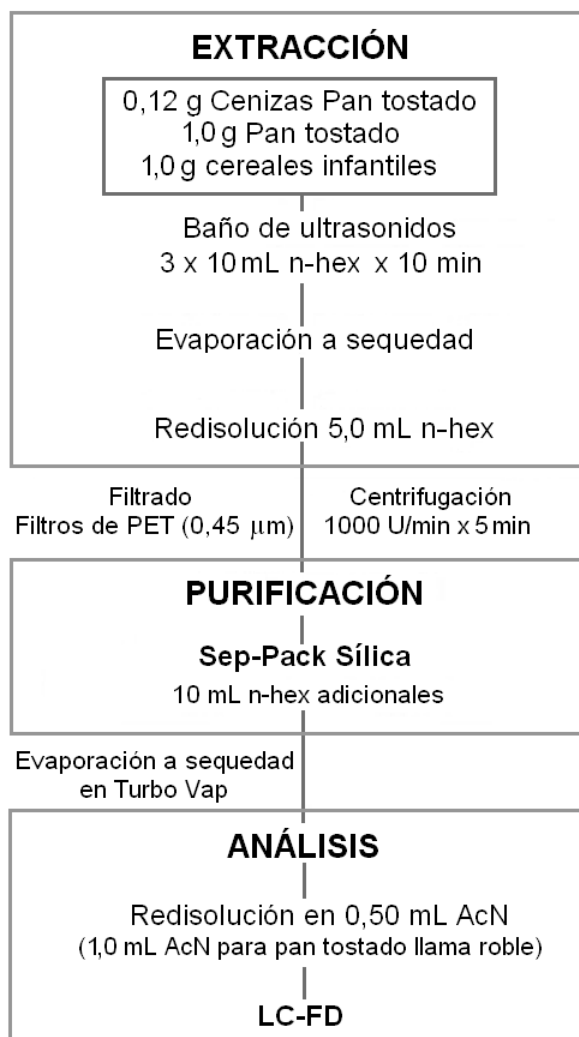
## 1.2. MUESTRAS DE CEREALES INFANTILES

Se analizaron 19 muestras de cereales infantiles de una marca comercial, de venta y consumo en nuestro país. Estas papillas están elaboradas a partir de una mezcla equilibrada de dos o más cereales (trigo, arroz, avena, cebada, centeno, maíz, mijo y sorgo), pudiendo ser alguno de ellos integral. Hay muestras que contienen además, frutas o miel, Y algunas están enriquecidas con proteínas y otros componentes para un mayor aporte energético y proteico. En la Tabla 3 del anexo se muestran algunas de sus características y los principales ingredientes que poseen.

Las muestras de pan tostadas en el laboratorio, han sido deshidratadas en estufa a 100 °C hasta peso constante (aproximadamente entre 30 minutos y una hora), posteriormente, de igual forma que las de pan comercial, han sido trituradas y homogeneizadas en un mortero. Por el contrario, las muestras de cereales infantiles se procesaron directamente, ya que, tienen un contenido de humedad muy reducido y un tamaño de partícula muy fino y homogéneo. Todas las muestras se analizaron por duplicado, siguiendo el protocolo recogido en la **Figura 2**.

## 2. DETERMINACIÓN DE PAHs

Se determinaron 11 PAHs (B[a]A, Chr, 5-MChr, B[j]F, B[b]F, B[k]FA, B[a]P, DB[a,h]A, DB[a,l]P, B[ghi]P, I[1,2,3-cd]P), todos ellos reconocidos por la Unión Europea como posibles cancerígenos en alimentos. El protocolo seguido, es el mismo que se empleó para el procesado de las muestras de leche en polvo y moluscos bivalvos (capítulos III y V) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Esquema del protocolo para la determinación de PAHs en las muestras de pan tostado y cereales infantiles.

Para la validación del método se ha elegido como representante de los dos tipos de alimentos ricos en carbohidratos, el pan tostado comercial.

Para evaluar la precisión (% RSD) y la recuperación (%R), se sobrecargaron tres muestras de pan comercial (muestra N°1) a los niveles de concentración mostrados en la **Tabla 2**. Antes de ser procesadas siguiendo el protocolo analítico descrito anteriormente, las muestras se mantuvieron durante 24 horas para facilitar el correcto reparto de los analitos en la matriz. Previamente se comprobó que este producto no contenía PAHs a niveles cuantificables. Como se recoge en la **Tabla 2**, el porcentaje de recuperación, superior al 82 con coeficientes de variación (%RSD) inferiores a 8,1% en todos los casos.

**Tabla 2.** % R y % RSD obtenidos al analizar por triplicado una muestra de pan comercial (muestra nº1) sobrecargada ( $\mu\text{g/Kg}$ ).

PAHs	Sobrecarga	%R	%RSD
B[a]A	0,42	82	3,0
Chr	2,5	85	1,6
5-MChr	2,5	103	1,1
B[ <i>j</i> ]F	7,0	95	4,4
B[ <i>b</i> ]F	0,75	92	5,9
B[ <i>k</i> ]F	0,10	102	8,1
B[a]P	0,26	103	5,0
DB[a, <i>i</i> ]P	3,0	90	4,6
DB[a, <i>h</i> ]A	0,90	97	4,0
B[ <i>ghi</i> ]P	7,0	98	3,0
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	3,6	89	3,0

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se han calculado de igual manera que en los capítulos anteriores [ACS, 1980] (Tabla3), comprobándose que el LC del B[a]P es muy inferior a  $1,0 \mu\text{g/Kg}$ , nivel máximo permitido por la legislación para alimentos infantiles.

**Tabla 3.** Límites de detección y de cuantificación para cada PAH en pan tostado ( $\mu\text{g/Kg}$ ).

PAHs	LD	LC
B[a]A	0,040	0,10
Chr	0,25	0,75
5-MChr	0,12	0,35
B[ <i>j</i> ]F	0,65	1,7
B[ <i>b</i> ]F	0,10	0,25
B[ <i>k</i> ]F	0,010	0,025
B[a]P	0,025	0,075
DB[a, <i>i</i> ]P	0,16	0,50
DB[a, <i>h</i> ]A	0,10	0,25
B[ <i>ghi</i> ]P	0,70	1,7
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	0,35	1,0

American Chemical Society (ACS), 1980. Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry. Guidelines for data acquisition and data evaluation in environmental chemistry. Analytical Chemistry. 522242-522249.

## 2.1. DIFICULTAD EN LA EXTRACCIÓN DE PAHs POR LA PRESENCIA DE CENIZAS EN LAS MUESTRAS DE PAN

Desde el punto de vista analítico, la presencia de ceniza en la muestra de pan, puede dificultar en gran medida la extracción de los PAHs. Este hecho lo comprobaron **Rey-Salgueiro y col., 2004**, y **García-Falcón y col., 2006**, en un estudio realizado con cenizas de madera obtenidas a diferentes condiciones de combustión. Observaron que si la madera se quemaba a elevadas temperaturas, se generaban cenizas con gran capacidad para adsorber PAHs, debido a su elevado contenido en carbón activo. Estos mismos autores pusieron de manifiesto que, ninguno de los métodos recogidos en la bibliografía resultaba efectivo para la extracción de PAHs en este tipo de matriz, obteniéndose porcentajes de recuperación mínimos, incluso sobrecargando las muestras con niveles de PAHs muy elevados (1100 µg/kg).

Todos los panes comerciales analizados, presentaban un nivel de tostado ligero y teniendo en cuenta que el tostado del pan a nivel industrial, se lleva a cabo generalmente entre 200 y 220 °C, no es común que estos productos presenten calcinaciones parciales. A diferencia del proceso industrial, el tostado a nivel doméstico está menos controlado, pudiendo llegar a alcanzarse temperaturas bastante más elevadas, lo que podría conllevar un quemado parcial del alimento con formación de carbonilla en su superficie.

Por tanto, si las muestras de pan objeto de estudio presentasen PAHs y cenizas con capacidad adsorbente, estaríamos subestimando los niveles de estos residuos, ya que el carbón activo de estas cenizas actuaría reteniéndolos y dificultando su extracción. Para poder evaluar este fenómeno, y comprobar a partir de qué temperatura se comienza a generar carbón activo en las muestras de pan, se hicieron los siguientes ensayos: se obtuvieron cenizas de pan, por calentamiento en mufla, a tres rangos de temperatura (300, 500 y 700 °C). Una cantidad de ceniza (0,12 g) se sobrecargaron con PAHs a los niveles recogidos en la **Tabla 4** y se procesaron siguiendo el protocolo analítico anteriormente explicado. Como se observa en la **Tabla 4**, las cenizas de 300 °C no dan problemas desde el punto de vista analítico, ya que las recuperaciones son satisfactorias para todos los PAHs. Son de destacar los elevados porcentajes de recuperación obtenidos para los PAHs con bajo peso molecular (B[a]A, Chr, 5-MChr), debido probablemente a la gran cantidad de interferencias que eluyen a bajos tiempos de retención. Las cenizas de 500 °C probablemente ya presenten trazas de carbón activo, lo que se manifiesta en una caída de las recuperaciones, especialmente las de los PAHs con mayores pesos moleculares. A 700 °C la síntesis de carbón activo ya es muy evidente, puesto

---

**Rey-Salgueiro, L.; García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J., 2004.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3900-3904.

**García-Falcón, M.S.; Soto-González, B.; Simal-Gándara, J.; 2006.** Environmental Science and Technology, 40, 759-763.

que con el protocolo propuesto el porcentaje de recuperación es inferior al 5 % por lo que no sería cuantitativo para ninguno de los PAHs.

Las muestras de pan tostadas experimentalmente en el laboratorio, tienen todas ellas carbonilla. De acuerdo con los resultados comentados, si esta carbonilla se generase a temperaturas superiores a 500 °C, el protocolo analítico no resultaría eficiente para la cuantificación de los PAHs, ya que la extracción no sería completa. Como se puede comprobar en la **Tabla 1**, la temperatura alcanzada por las muestras de pan no sobrepasó en ningún momento los 500 °C.

**Tabla 4.** % R y % RSD obtenidos al analizar por triplicado una muestra de cenizas de pan obtenida a 300 °C y 500 °C sobrecargada (µg/Kg).

PAHs	RECUPERACIONES		Sobrecarga
	300 °C	500 °C	
<b>B[a]A</b>	86 ± 6,0	81 ± 5,0	0,42
<b>Chr</b>	152 ± 2,7	79 ± 0,50	2,5
<b>5-MChr</b>	143 ± 3,0	75 ± 2,5	2,5
<b>B[<i>j</i>]F</b>	126 ± 4,60	68 ± 3,4	7,0
<b>B[<i>b</i>]F</b>	124 ± 1,4	69 ± 0,30	0,75
<b>B[<i>k</i>]F</b>	101 ± 9,1	77 ± 3,0	0,10
<b>B[a]P</b>	105 ± 5,3	7,0 ± 2,0	0,26
<b>DB[a,<i>l</i>]P</b>	91 ± 4,6	51 ± 2,0	3,0
<b>DB[a,<i>h</i>]A</b>	98 ± 3,3	47 ± 3,0	0,90
<b>B[<i>ghi</i>]P</b>	101 ± 2,3	44 ± 2,1	7,0
<b>I[1,2,3-<i>cd</i>]P</b>	103 ± 6,5	43 ± 4,0	3,6

### 3. NIVELES DE PAHs EN PAN TOSTADO Y CEREALES INFANTILES

#### 3.1. NIVELES DE PAHs EN MUESTRAS COMERCIALES

##### 3.1.1. Pan tostado

Como se ha comentado anteriormente, se hizo un estudio de mercado de las marcas comerciales de pan tostado que ofrecen una mayor gama de productos. En general, los niveles de PAHs encontrados fueron muy bajos, sólo 3 muestras de las 24 presentaron niveles cuantificables de B[a]A, B[b]F, B[k]F y B[a]P, oscilando el total de sus concentraciones entre 0,64 y 0,74 µg/Kg (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Niveles de PAHs encontrados en las muestras de pan comercial (µg/Kg ± s.d.).

PAHs	Muestras		
	nº 5	nº 6	nº 16
B[a]A	0,16 ± 0,037	nd	0,19 ± 0,051
Chr	nd	nd	nd
5-MChr	nd	nd	nd
B[ <i>j</i> ]F	nd	nd	nd
B[b]F	0,25 ± 0,0030	0,45 ± 0,027	0,25 ± 0,067
B[k]F	0,098 ± 0,0070	0,060 ± 0,0060	0,059 ± 0,0040
B[a]P	0,23 ± 0,012	0,13 ± 0,090	0,19 ± 0,013
DB[a, <i>i</i> ]P	nd	nd	nd
DB[a]A	nd	nd	nd
B[ <i>ghi</i> ]P	nd	nd	nd
I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	nd	nd	nd
ΣPAHs	0,74	0,64	0,69
FTE	0,24	0,14	0,20

La procedencia de estos PAHs podría ser doble: la contaminación en origen de las materias primas empleadas en la elaboración o el tratamiento térmico al que han sido sometidas. Es difícil saber si la fuente de contaminación es el tostado, porque las empresas guardan con celo el proceso tecnológico que emplean. De todas las muestras analizadas, 9 hacen alusión



en su etiquetado a un proceso de tostado directo: “a fuego lento”, concretamente estas muestras no presentan PAHs. En el resto de los productos no se hace ninguna mención al proceso tecnológico aunque, por el aspecto del pan tostado, se sospecha que emplean hornos eléctricos o de gas. Tal y como se comprobó en el presente estudio, esta técnica de tostado no da lugar a residuos, por tanto, la contaminación de estas 3 muestras probablemente se deba a una contaminación en origen de las materias primas empleadas.

Los niveles encontrados en las muestras estudiadas fueron semejantes a los obtenidos por **Kayali-Sayadi y col., 2000**, y **Nieva-Cano y col., 2001**. **Kayali-Sayadi y col., 2000**, encontraron naftaleno, acenafteno, fenantreno y DB[ah]A en cuatro muestras de pan tostado comercial, de los cuales el único cancerígeno es el DB[a]A (0,32 µg/Kg). **Nieva-Cano y col., 2001** estudiaron la presencia de 16 PAHs en muestras de pan tostado comercial y tan sólo 6 fueron encontrados a niveles cuantificables, siendo el Chr el único con propiedades cancerígenas (<10,0 µg/Kg).

Hay autores que verifican mayores contenidos de PAHs en aquellos alimentos que están elaborados a base de harina integral. **Dennis y col., 1991**, encontraron 1,5 µg/Kg de PAHs totales en harina blanca y 5,6 µg/Kg en salvado. En el presente trabajo no se encontró claramente esta tendencia aunque sí una de las muestras que presentan PAHs son integrales. Estos mismos autores también comprobaron que las grasas y los aceites constituían unos de los alimentos con mayor grado de contaminación debido a su carácter lipofílico. De manera que aquellos alimentos hidrocarbonados (bollería industrial, pan, etc) con un elevado porcentaje de grasa también contienen mayores niveles de PAHs. En este estudio, los 3 panes que exhiben PAHs tienen, en general, niveles elevados de este principio inmediato, entre 6,0 y 12%.

No existe ningún límite máximo legal de la presencia de PAHs en alimentos tostados. Aún así, el contenido de B[a]P encontrado en las muestras es menor a cualquiera de los límites establecidos para otros alimentos en el **Reglamento comunitario 1881/2006**. Donde oscilan entre 1,0 µg/Kg, para alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad, y 10 µg/Kg, para moluscos bivalvos. Por ello, se puede concluir que el pan tostado comercial no supone riesgo alguno para el consumidor, aún a pesar de ser un alimento importante en la dieta de la población española.

---

**Kayali-Sayadi, M.N.; Rubio-Barroso, S.; García-Iranzo, R.; Polo-Díez, L.M., 2000.** Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 23(12), 1913-1925.

**Nieva-Cano, M.J.; Rubio-Barroso, S.; Santos-Delgado, M.J., 2001.** Analyst, 126, 1326-1331.

**Dennis, M.J.; Massey, R.C.; Cripps, G.; Venn, I.; Howarth, N.; Lee, G., 1991.** Food Additives and Contaminants, 8, 4, 517-530.

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Además del contenido de PAHs, también se calculó el factor de equivalencia tóxica total de cada una de las muestras de pan de acuerdo con **Nisbet y LaGoy., 1992**. Teniendo en cuenta que la distribución relativa de cada PAH con respecto al total es muy similar en las tres muestras, el FTE no difiere demasiado con respecto a los resultados obtenidos en µg/Kg (**Tabla 6**).

### 3.1.2. Cereales infantiles

Los cereales infantiles durante su elaboración se someten a una etapa de tostado a 120-150 °C seguida de un secado a 115-170 °C. Se analizaron 22 muestras productos de venta y consumo en nuestro país. En todas ellas los niveles de PAHs no fueron detectables.

En la bibliografía manejada, prácticamente no se recoge ningún trabajo en el que evalúe el contenido de PAHs en alimentos infantiles a base de cereales. Tan sólo, en el año 2006, la Agencia de Seguridad Alimentaria Británica (FSA) determinó 15 PAHs en 111 alimentos infantiles, de los cuales 16 estaban elaborados a base de cereales. Las concentraciones fueron en todos los casos inferiores a 1,0 µg/kg, nivel máximo de B[a]P establecido por la UE para alimentos infantiles, por lo que se puede concluir, que los cereales infantiles no suponen un riesgo para el consumidor [**Food Standards Agency, 2006**].

## 3.2. NIVELES DE PAHs EN PAN TOSTADO EN EL LABORATORIO

El proceso de tostado puede contribuir a la contaminación con PAHs por dos vías: pirólisis directa de los principios inmediatos y deposición sobre el producto de los humos generados durante la combustión. En este trabajo se ensayaron diferentes modalidades de tostado. Unas permiten el contacto del humo generado en la combustión con el alimento: tostado directo (en horno de gas, a la brasa y en presencia de llama viva) y otras no: tostado indirecto (en horno eléctrico y tostadora). Previamente al análisis de las muestras de pan tostado, se comprobó que el pan sin tostar no contiene PAHs. En la siguiente Tabla (**Tabla 6**) se recogen los resultados obtenidos.

---

Nisbet, I.C.; LaGoy, P.K., 1992. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 16, 290-300.

Food Standards Agency, 2006. PAHs in baby foods and infant formulae. Food Surveillance Information Sheet, 09/06. [www.food.gov.uk/news/newsarchive/2006/may/pahsurvey](http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2006/may/pahsurvey).

**Tabla 6.** FTE y niveles de PAHs (µg/Kg ± s.d.) encontrados en las muestras de pan tostado en el laboratorio. (\*)Zona interferida

TOSTADO INDIRECTO					TOSTADO DIRECTO						
PAHs	Horno Eléctrico	Mufia		Tostadora	Horno Gas	Brasa			Llama		
		200 °C	300 °C			Carbón	Roble	Envuelto	Sartén	Gas	
B[a]A	nd	2,1* ± 0,42	1,2* ± 0,16	nd	nd	2,1 ± 0,20	119 ± 10	0,68 ± 0,058	nc	0,46 ± 0,012	
Chr	nd	nd	nd	nd	nc	1,8 ± 0,25	49 ± 8,2	0,31 ± 0,052	4,3 ± 6,4	nd	
5-MChr	nd	10* ± 2,3	nd	nd	nd	nd	42 ± 5,3	nc	5,3 ± 7,9	nd	
B[ <i>l</i> ]F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
B[b]F	nd	nd	1,1 ± 0,19	nd	nc	1,7 ± 0,10	47 ± 6,3	0,11 ± 0,015	nc	nc	
B[k]F	nd	0,12 ± 0,024	0,31 ± 0,020	nd	nc	0,40 ± 0,040	25 ± 4,9	0,075 ± 0,015	0,18 ± 0,24	0,50 ± 0,024	
B[a]P	nd	0,50 ± 0,25	0,80 ± 0,13	nd	nc	1,06 ± 0,11	66 ± 9,4	0,51 ± 0,072	0,43 ± 0,56	0,23 ± 0,010	
DB[a, <i>l</i> ]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nc	nd	nd	nd	
DB[a]A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
B[ghi]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nc	nd	nd	nd	
I[1,2,3-cd]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nc	nd	nd	nd	
ΣPAHs		2,7	3,4			7,06	348	1,7	10	1,2	
FTE		0,51	0,84			1,1	69	0,52	0,50	0,28	

Los resultados muestran que el tipo de tostado influye en el nivel de PAHs en el pan, siendo notablemente inferiores en el tostado indirecto.

En las muestras tostadas en horno eléctrico a 200 °C y con tostadora a 250-270 °C los niveles de PAHs no fueron detectables. Durante el tostado de los alimentos pueden producirse elevaciones puntuales de la temperatura, provocando calcinaciones parciales en el producto. Con el fin de estudiar con más detenimiento este proceso y comprobar si estas pérdidas de control contribuirían a la contaminación por PAHs se calcinaron dos muestras de pan durante 15 minutos a 300 y 500 °C. Al analizar las cenizas generadas se verificó que a 300 °C comienzan a formarse PAHs, encontrándose a elevadas concentraciones B[a]A (2,1 µg/Kg) y 5-MChr (10 µg/Kg) y trazas de B[k]F y B[a]P (0,12 y 0,50 µg/Kg, respectivamente). Aún así es de destacar que la zona donde eluyen los PAHs de más bajo peso molecular está muy interferida. Por ello no se descarta que otras sustancias pudieran coeluir con los analitos de interés. Al aumentar la temperatura a 500 °C, los niveles de los residuos más cancerígenos (B[b]F, B[k]FA, B[a]P) se ve incrementada, no así los analitos de menor peso molecular, probablemente al ser estos últimos más volátiles se pierdan debido a las altas temperaturas. Aún así, los niveles encontrados en estas cenizas no son alarmantes, de manera que, aunque el tostado de los alimentos sea muy severo, siempre que no se sobrepasen los 500 °C, no constituirá un riesgo para la salud. Estos resultados también demuestran que la pirólisis de los principios inmediatos del pan (fundamentalmente almidón) a temperaturas inferiores a 550 °C no constituye una importante fuente de PAHs.

Resultados similares a estos fueron recogidos por **Fazio y Howard, 1983**, al analizar cenizas obtenidas de calentar almidón a distintas temperaturas. Comprobaron que a temperaturas inferiores a 370 - 390 °C los niveles de B[a]P no sobrepasaban los 0,70 µg/Kg. Este valor se incrementa hasta 17 µg/Kg si la temperatura alcanza los 650 °C. **Fazio y Howard, 1983**, tampoco encontraron B[a]P a niveles detectables, en las cenizas resultantes de calentar carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos a 300 °C. En cambio 19 PAHs, incluido el B[a]P, fueron cuantificados en los mismos productos obtenidos a 500 - 700 °C.

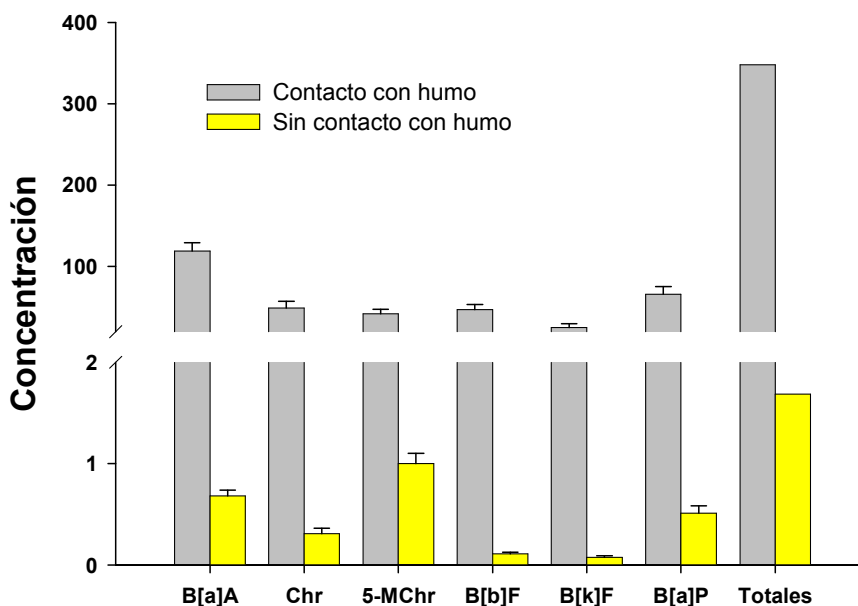
El tostado directo produce mayor carga de PAHs que el indirecto. De las tres modalidades ensayadas (**Tabla 6**), es la llama viva con roble la que aporta una mayor contaminación, seguida del tostado a la brasa con carbón y del tostado a la llama de gas. El tostado a la brasa con madera de roble y el horno de gas prácticamente no generan residuos.

En el tostado directo la contaminación con PAHs puede deberse, no sólo a la pirólisis de los principios inmediatos, sino también a la deposición de los humos producidos en la combustión. Tal y como se comprobó anteriormente, el

---

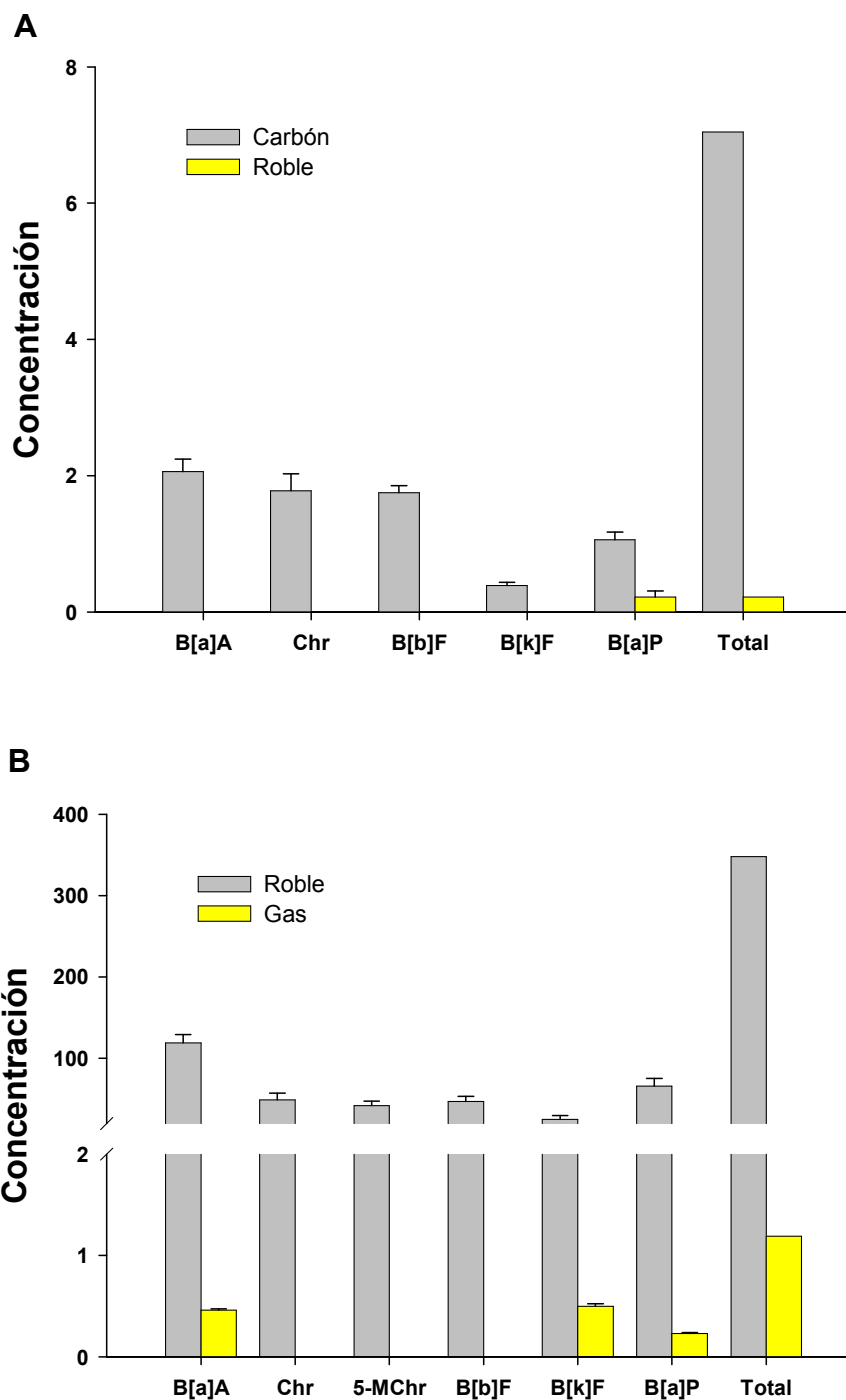
Fazio, T.; Howard, J.W., 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: In: Bjorseth A, ed., Hadbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. New York: Marcel Deeker, 461-505.

proceso de pirólisis aporta pocos PAHs al alimento, por tanto serán las emisiones de humo y partículas las que más contribuirán a la contaminación. Hecho que se comprobó tostando, a la llama viva de roble, un pan envuelto en papel de aluminio, otro con una sartén y otro sin ningún tipo de protección. El contenido de PAHs en las muestras en que se limitó el contacto con las emisiones se redujo prácticamente en su totalidad, 99% en el envuelto (**Figura 3**) y un 97% en el caso del tostado en la sartén.



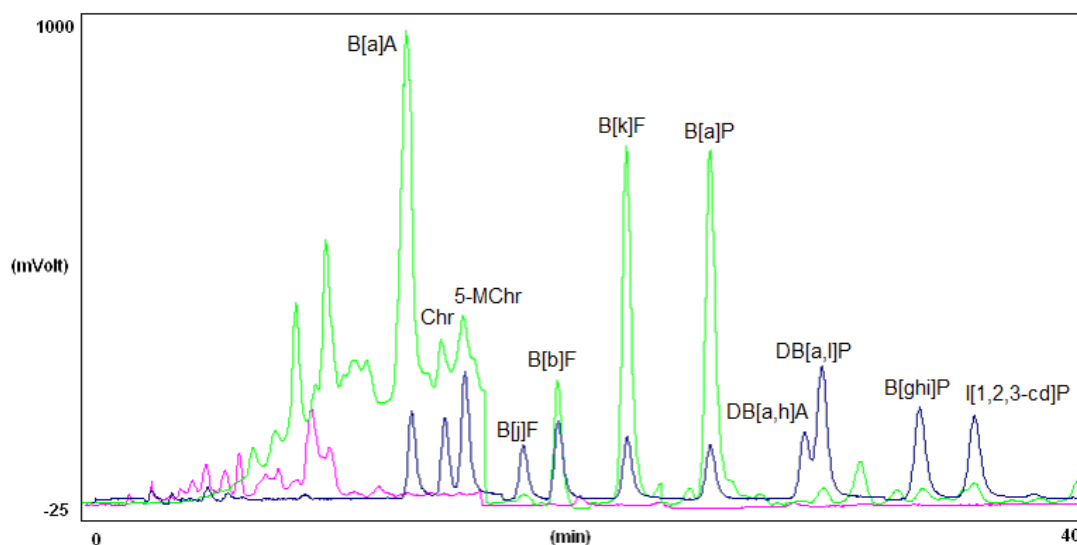
**Figura 3.** Concentraciones en (µg/kg) de PAHs en las muestras de pan tostado en el laboratorio en presencia de llama de roble, con y sin contacto con humo (envuelto).

La carga de PAHs en el humo estará condicionada por el tipo de combustible empleado (carbón, madera, gas, etc), por la presencia o ausencia de llama, cantidad de materia particulada generada, temperatura, etc. De todos los materiales ensayados en este trabajo, es la combustión de la madera de roble con llama la que alcanza temperaturas más elevadas (**Figura 4**). Esto conllevará a una mayor carga de PAHs en los humos emitidos, los cuales vehiculizarán estos residuos hasta el alimento. En un estudio anterior realizado por el grupo de investigación, ya se comprobó que los humos generados por la combustión de madera sin llama a bajas temperaturas, prácticamente no genera PAHs, mientras que los producidos en presencia de llama tienen grandes cantidades [**Rey-Salgueiro y col., 2004; García-Falcón y Simal-Gándara, 2005**].



**Figura 4.** Concentraciones de PAHs en las muestras de pan tostado en el laboratorio (µg/Kg): (A) tostado a la brasa de carbón y roble; (B) tostado con llama de gas y roble.

En la **Figura 5** se muestra un cromatograma de un extracto correspondiente a una muestra de pan tostado a la llama viva de roble frente a una tostada en tostadora



**Figura 5.** Cromatogramas correspondientes a una muestra de pan tostado a la llama viva con madera de roble (trazo verde), a una muestra de pan tostado en tostadora (trazo rosa) y a un patrón de PAHs con un rango de concentraciones entre 14  $\mu\text{g/L}$ , para el B[ghi]P, y 0,20  $\mu\text{g/L}$  para el B[k]F.

Resultados similares a los encontrados en este estudio fueron obtenidos por aquellos autores que estudiaron los efectos de diferentes técnicas culinarias (cocinado al vapor, asado al horno, asado a la barbacoa, ahumado, fritura, etc.) sobre la contaminación con PAHs [Larsson y col., 1983; Chen y Lin, 1997; Kazerouni y col., 2001]. Todos ellos concluyen que es el cocinado a la barbacoa (técnica de cocinado directa) el que aporta, con diferencia, una mayor carga de estos residuos a los alimentos. Al igual que en este trabajo, atribuyen la contaminación por PAHs durante el asado a la barbacoa, a la deposición de los humos sobre los alimentos.

Con respecto a la naturaleza del combustible empleado, Larsson y col., 1983, comprobaron en salchichas cocinadas a la parrilla, que es la llama generada por la combustión de madera la que da lugar a una mayor contaminación por estos residuos. Estos autores encontraron niveles de B[a]P (54  $\mu\text{g/Kg}$ ) similares a los obtenidos en el pan tostado en presencia de llama de roble (66  $\mu\text{g/Kg}$ ). Al igual que en el presente estudio, si las salchichas se cocinaban en ausencia de llama, es decir sobre las brasas, la cantidad de B[a]P se reducía considerablemente (de 54 a 8,0  $\mu\text{g/Kg}$ ).

Como ya se ha comentado anteriormente, no existe ningún límite máximo legal de la presencia de PAHs en alimentos tostados. En el

Larsson, B.K.; Salhberg, G.; Eriksson, A.T.; Busk, L.Å., 1983. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31, 867-873.

Chen, B.H.; Lin, Y.S., 1997. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1394-1403.

Kazerouni, N.; Sinha, R.; Hsu, C.-H.; Greenberg, A.; Rothman, N., 2001. Food and Chemical Toxicology, 39, 423-436.

**Reglamento comunitario 1881/2006** se establecen los límites máximos de B[a]P en diferentes alimentos susceptibles de presentar contaminación por PAHs. Estos niveles oscilan entre 1,0 µg/Kg, para alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad, y 10 µg/Kg, para moluscos bivalvos. El contenido de B[a]P encontrado en el pan tostado a la llama de roble (66 µg/Kg) está muy por encima de estos límites. Por ello, se puede concluir que el pan tostado a la llama de roble supone un riesgo para el consumidor. Se recomienda a las industrias y a los consumidores que tuesten el pan mediante técnicas que eviten el contacto entre el humo y el alimento.

Además del contenido de PAHs, también se calculó el factor de equivalencia tóxica total de cada uno de los panes tostados en el laboratorio. (**Tabla 6**). Al igual que en las muestras de pan tostado comercial, el FTE no difiere demasiado con respecto a los resultados obtenidos en µg/Kg.

---

**Reglamento (CE) 1881/2006** de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.



## **Conclusiones**





**Primera:** Se ha determinado el contenido de PAHs en diferentes estratos de la turbera ombrotónica de Penido Vello, localizada en la Sierra de O Xistral, con el fin de interpretar el patrón de acumulación de estos contaminantes en los últimos 1000 años.

Los resultados han mostrado que los PAHs encontrados en las diferentes muestras de turba, proceden esencialmente de la deposición atmosférica. Hay notables diferencias en la carga de estos residuos a lo largo de toda de la turbera, observándose claramente dos épocas en las que sus concentraciones superan la contaminación de fondo: La Plena Edad Media (s.XII-XV) y el comienzo de la Revolución Industrial (1760-1780). La primera coincide en Europa con un espectacular desarrollo demográfico y económico, donde la industria metalúrgica y la agricultura cobran gran relevancia. Con la invención de la máquina de vapor, el carbón se convierte en el combustible por excelencia en la industria y en el transporte, dando comienzo a la Revolución Industrial. A partir de 1960 y como resultado de la regulación de la contaminación del aire, se observa un descenso progresivo de la carga contaminante en la turbera. A la vista de los resultados se puede concluir que este tipo de muestras constituyen un registro fiable de la deposición de PAHs, permitiendo reconstruir la contaminación medioambiental a lo largo de la historia.

**Segunda:** Con el fin de evaluar el impacto del incendio de una factoría de productos químicos (Caldas de Reis, Pontevedra), se ha determinado el nivel de PAHs en diversos productos hortofrutícolas, recogidos en el área de influencia del suceso.

Se encontraron PAHs en todas las muestras analizadas, comprobándose que son los vegetales con mayor superficie, los que están más expuestos a la contaminación por deposición atmosférica. Aún así, los niveles totales de PAHs detectados han sido bajos, pudiéndose concluir que estos alimentos no constituyeron en ningún momento un riesgo para la salud del consumidor.

**Tercera:** Se chequeó el contenido de PAHs nativos y sus metabolitos en fórmulas lácteas infantiles de venta y consumo en nuestro país.

Para determinar los metabolitos de PAHs hidroxilados y sus conjugados fue necesario desarrollar previamente un método analítico apropiado. El protocolo incluye extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos, hidrólisis enzimática, purificación/concentración a través de mini columnas C18 y análisis mediante LC-FD. El método resulta adecuado para el análisis de leche en polvo, como lo demuestran sus parámetros de validación (%R > 79 y %RSD < 7,0).

No se detectaron ninguno de los PAHs nativos ni sus correspondientes metabolitos a niveles cuantificables. Por lo que se podría concluir que este alimento carece de riesgo alguno para la población infantil.

**Cuarta:** Se evaluó el grado de contaminación por PAHs y sus metabolitos al que están expuestas diferentes especies animales (caballo, vaca, conejo y cerdo), a través del análisis de sus excretas.

En todas las muestras analizadas se encontró B[a]P, B[b]F, B[k]F y 3-OH- B[a]P a niveles cuantificables, presentando las excretas de caballo y vaca los mayores niveles. A diferencia del cerdo y del conejo, estas dos especies animales pastan a diario en zonas altamente contaminadas próximas a Vigo. Al pastar, incorporan en su dieta grandes cantidades de suelo, probablemente con elevadas concentraciones de PAHs dada su capacidad adsorbente. Las diferencias en el tracto gastrointestinal de la vaca y del caballo, podrían explicar las diferencias en la proporción de metabolitos detectadas en sus excretas.

En base a los bajos niveles de residuos presentes en estos estiércoles, podrían ser empleados como abonos orgánicos.

**Quinta:** Se ha determinado el contenido de PAHs en diferentes moluscos bivalvos (almejas, berberechos, mejillones y navajas), producidos en las rías gallegas y comercializados en conserva, con el fin comprobar su adecuación a la normativa vigente.

En los bivalvos estudiados se han detectado P, B[b]F, B[k]F, B[a]P y B[ghi]P. Ninguna de las muestras ha superado el límite máximo legal establecido para el B[a]P de 10 µg/Kg. De todos los moluscos estudiados, el mejillón es el que presenta una mayor carga de PAHs, diferencia que puede ser atribuida a factores como el hábitat o el contenido lipídico.

La concentración de PAHs fue superior en los moluscos comercializados al natural frente a los enlatados en escabeche. Esta diferencia se ha atribuido a la migración de estos compuestos desde el alimento hacia el aceite de cobertura, dado su carácter lipídico.

**Sexta:** Se ha evaluado el efecto de las altas temperaturas sobre la formación de PAHs en dos alimentos ricos en hidratos de carbono, pan y cereales infantiles.

Al chequear distintas técnicas de tostado, se comprobó que aquellas que permiten la deposición de los humos sobre la superficie de los alimentos, son las que generan una mayor contaminación.

Al analizar distintas muestras de pan tostado y cereales infantiles de venta y consumo en España, se comprobó que los niveles de PAHs totales oscilaron entre n.d. y 0,68 µg/Kg. En ninguna de las muestras se detectó BaP por encima de los límites establecidos por la legislación.



**Anexo**







**Tabla 1.** Ingredientes principales e información nutricional (por 100 g de producto) de las muestras de leche infantil analizadas.

Muestra	Información nutricional (100 mL)			Ingredientes principales
	Proteínas	Hidratos	Lípidos	
1	1,5	8,2	3,6	Lactosa, aceite vegetal, leche desnatada, dextrinomaltoza, proteínas séricas, fosfolípidos del huevo.
2	2,3	7,7	3,7	Suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceite vegetal, dextrinomaltoza, proteínas séricas, fosfolípidos de huevo.
3	1,6	8,0	3,6	Suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceite vegetal, dextrinomaltoza, proteínas séricas.
4	2,1	8,4	3,2	Suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceite vegetal, dextrinomaltoza, proteínas séricas.
5	1,7	8,1	3,6	Lactosa, aceites vegetales, leche desnatada, dextrinomaltoza, proteínas séricas, fosfolípidos de huevo.
6	1,5	8,3	3,6	Lactosa, aceites vegetales, leche desnatada, dextrinomaltoza, proteínas séricas, triglicéridos de cadena media.
7	2,3	7,7	3,7	Leche desnatada, aceites vegetales, dextrinomaltoza, proteínas séricas, lactosa, fosfolípidos de huevo.
8	2,0	8,0	3,7	Dextrinomaltoza, aceites vegetales, leche desnatada, lactosa, proteínas séricas, triglicéridos de cadena media.
9	1,7	7,8	3,2	Lactosa, dextrinomaltoza, aceite vegetal, proteína de suero parcialmente hidrolizada, fructooligosacáridos, espesante (harina de semillas de algarrobo) (2 %).
10	2,1	7,7	3,2	Lactosa, dextrinomaltoza, aceite vegetal, proteína de suero parcialmente hidrolizada, fructooligosacáridos, (3 %) espesante (harina de semillas de algarrobo).

**Tabla 1 (continuación).** Ingredientes principales e información nutricional (por 100 g de producto) de las muestras de leche infantil analizadas.

Muestra	Información Nutricional (100 mL) (g)			Ingredientes principales
	Proteínas	Hidratos	Lípidos	
11	1,6	7,9	3,6	Suero lácteo desmineralizado, aceite vegetal (Betapol®), leche desnatada, lactosa, fosfolípidos de huevo.
12	2,1	8,4	3,2	Suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceite vegetal (Betapol®), dextrinomaltoza, proteínas séricas.
13	1,7	6,97	3,9	Suero lácteo desmineralizado, aceite vegetal, dextrinomaltoza, leche desnatada, galactooligosacáridos, fosfolípidos de huevo.
14	1,6	7,5	3,6	Suero lácteo desmineralizado, aceite vegetal, leche desnatada, lactosa, espesante (harina de semillas de algarrobo), fosfolípidos de huevo.
15	2,1	8,0	4,6	Suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceite vegetal, dextrinomaltoza, proteínas séricas, espesante (harina de semillas de algarrobo).
16	2,2	8,2	3,2	Dextrinomaltoza, aceites vegetales, aislado de proteínas de soja, sales minerales, complejo vitamínico.
17	1,9	8,3	3,1	Dextrinomaltoza, aceites vegetales, hidrolizado de suero, hidrolizado de caseína, triglicéridos de cadena media.
18	1,8	7,9	3,6	Aceite vegetal, proteínas séricas, caseinato.
19	2,3	8,1	3,0	Leche desnatada, aceites vegetales, dextrinomaltoza, sacarosa, miel.

**Tabla 2.** Ingredientes principales y características más relevantes de las muestras de pan tostado comercial.

Muestra	Denominación	Información nutricional por 100g (g)				Ingredientes
		proteínas	hidratos	lípidos	fibra	
1	Pan tostado tradicional	11,5	72,2	3,4	7	Harina de trigo, grasa vegetal, extracto de malta, levadura, azúcar, sal, emulgente (E-472e, lecitina)
2	Pan tostado Normal con leche y Ca	10,3	71,5	6	5,7	Harina de trigo, levadura, grasa vegetal, azúcar, jarabe de glucosa y fructosa, leche descremada en polvo reconstituida (2.5%), sal, sales minerales (fosfato de calcio, 0.5%), harina de cebada malteada, antioxidante (ácido ascórbico)
3	Panecillos tostados Normal	10,5	70,2	9,1	4	Harina de trigo, grasa vegetal, azúcar, levadura, sal
4	Panecillos tostados clásicos	11,1	68,7	6,4	6,2	Harina de trigo, gasa vegetal, azúcar, levadura, sal
5	Grilletines Tradicional	11	65,7	9	4,5	Harina de trigo, azúcar, aceite vegetal (palma), levadura, gluten de trigo, extracto de malta de cebada, leche desnatada en polvo, sal, emulgente (E-742e), regulador de acidez (carbonato cálcico), agente de tratamiento de harina (ácido ascórbico), enzimas
6	Pan tostado sin sal y sin azúcar	12,2	70,1	6,2	6,2	Harina de trigo, levadura, grasa vegetal, gluten de trigo, antioxidante (ácido ascórbico)
7	Pan tostado tradicional sin sal	11,4	74,2	2,9	6,4	Harina de trigo, gasa vegetal, extracto de malta, azúcar, levadura, emulgente (E-472e)
8	Pan tostado sin grasa y sin sal	12,6	74,5	1,1	5,5	Harina de trigo, levadura, inulina(4%, gluten de trigo, salvado de trigo, azúcar, jarabe de glucosa y fructosa, emulgente (E-472e), antioxidante (ácido ascórbico)
9	Pan tostado de leche	12,5	72,4	5,7		Harina de trigo, azúcar, leche en polvo (4%), levadura, grasa vegetal, sal iodada, aroma de mantequilla, (lecitina de soja)

**Tabla 2 (continuación).** Ingredientes principales y características más relevantes de las muestras de pan tostado comercial.

Muestra	Denominación	Información nutricional por 100g (g)				Ingredientes principales
		proteínas	hidratos	lípidos	fibra	
10	Pan tostado integral	12,6	63,8	6,6	10	Harina integral de trigo, levadura, grasa vegetal, jarabe de glucosa y fructosa, gluten de trigo, sal, antioxidante (ácido ascórbico)
11	Pan tostado integral	11,9	64,9	5,2	11,6	Harina integral de trigo, grasa vegetal, azúcar, levadura, extracto de malta, sal, emulgente (E-472e)
12	Pan tostado Integral	12,7	67,1	0,6	11	Harina integral de trigo, azúcar, fibra vegetal soluble, levadura, sal, aceite vegetal, emulsionante (E-472e)
13	Panecillos tostados integral	11,5	62,2	10,3	9	Harina de trigo, harina integral de trigo triturado (30%), grasa vegetal, azúcar, levadura, malta de cebada en polvo, sal, agente de tratamiento de la harina (ácido ascórbico)
14	Panecillos tostados integrales	11,3	61	8,6	10,7	Harina integral de trigo, grasa vegetal, azúcar, levadura, extracto de malta, sal, gluten de trigo, emulgente (E-472)
15	Pan tostado Con harina integral	12,4	71,4	5,4	8,1	Harina de trigo, harina integral de trigo (31%), semilla de sésamo, levadura, aceite de palma, harina de cereales malteados (trigo y cebada), sal, dextrosa
16	Grilletines integrales	13	58	12	12	Harina de trigo, harina integral de trigo triturado (12%), aceite vegetal (palma), azúcar, levadura, gluten de trigo, leche desnatada en polvo, extracto de malta de cebada, sal, emulgente (E-742e), regulador de acidez (carbonato cálcico), agente de tratam
17	Pan tostado integral sin sal y sin azúcar	13,6	62,4	7	10,4	Harina integral de trigo, grasa vegetal, levadura, gluten de trigo, antioxidante (ácido ascórbico)

**Tabla 2 (continuación).** Ingredientes principales y características más relevantes de las muestras de pan tostado comercial.

Muestra	Denominación	Información nutricional por 100g (g)				Ingredientes principales
		proteínas	hidratos	lípidos	fibra	
18	Pan tostado integral sin sal y sin azúcar	14	62,2	5,3	11,4	Harina integral de trigo, aceite vegetal, levadura, gluten de trigo sal, harina de cebada malteada, emulsionante (E-472e, E-471, lecitina de girasol), antioxidante (ácido ascórbico)
20	Pan tostado integral sin sal	13,7	67,5	0,6	12,3	Harina integral de trigo, azúcar, levadura, aceite vegetal, emulsionante (E-472e)
21	Pan tostado 10 cereales y fibra	12	68	6,1	7,4	Harina de trigo, cereales (21%): harina de triticales (30%), de avena (20%) de centeno (10%), de cebada malteada (10%), de arroz (,08%), de espelta (8,0%), de alforfón (5%), de mijo (5%), germen de trigo (3,0%), harina gruesa de panizo (,01%), levadura, jarabe de
22	Pan tostado multicereales (5 cereales y 3 semillas)	13,6	65,4	2,6	10,6	harina integral de trigo, azúcar, levadura, aceite vegetal, sal, harina de cebada malteada, harina de avena (14%), de centeno (1,0%), semilla de lino (0,6%), semilla de girasol (0,5%), semilla de sésamo (0,5%), salvado de centeno, lino dorado, harina de mijo
23	Panecillos tostados multicereales	12,3	62,9	4,8	10,1	Harina de trigo, levadura, salvado, harina de avena, (3,8%), de centeno (3,6%), de cebada (2,6%), azúcar, aceite vegetal, semilla de lino y lino dorado, semilla de sésamo, semilla de girasol, sal, extracto de harina de malta, mijo, emulsionante (E-472e)
24	Pan tostado Integral con 8 cereales 97% libre de grasas	14	64	2	12,3	Harina de trigo, azúcar, aceite vegetal, harina de cebada malteada (4,5%), de avena (4,0%), de triticales (4,0%), de centeno (3,5%), levadura, sal, harina de arroz (0,15%), de alforfón (0,15%), de mijo (0,15%), emulsionantes (E-472e, E-471)

**Tabla 3.** Ingredientes e información nutricional (por 100 g de producto) de las muestras de cereales infantiles analizadas.

Muestra	Características	Información nutricional 100g (g)			Ingredientes principales
		proteínas	hidratos	lípidos	
1	Sin gluten	6,4	83,9	1,4	Harinas de cereales dextrinados 81% (Arroz y Maíz), Azúcar
2	Sin gluten con fibra	7	80,8	1,2	Harinas de cereales dextrinados 80 % (Arroz integral y Maíz), Azúcar, Fructooligosacáridos 3%
3	Sin gluten	10,6	79,4	1,3	Harinas de cereales dextrinados 56 % (Arroz y Maíz), Dextrinomaltsa, Leche desnatada
5	Frutas	6	84,6	1,4	Harina de cereales dextrinados 72% (arroz y maíz), Azúcar, Pulpas de Frutas 25%
6	Frutas con fibra	6	80,6	1	Harinas de cereales dextrinados 68 % (Arroz integral y Maíz), Azúcar, Pulpas de frutas 25%, Fructooligosacáridos 3%
7	Frutas	10	80,6	1,2	Harinas de cereales dextrinados 56% (arroz y maíz), Pulpas de frutas 25%, Azúcar
8	5 cereales	9,5	78,9	1,8	Harinas de cereales dextrinados 84% (Trigo, Arroz, Avena, Cebada, Centeno) Azúcar
9	5 cereales con fibra	8,8	76,2	1	Harinas de cereales dextrinados 80 % (Trigo integral, Arroz integral, Avena, cebada, centeno), Azúcar
10	5 cereales	12	77	2,3	Harinas de cereales dextrinados 56% (trigo, arroz, avena, cebada, centeno), Leche desnatada, Azúcar
11	8 cereales	8	80,7	1,3	Harinas de cereales dextrinados 70% (trigo, arroz, avena, cebada, centeno, maíz, mijo y sorgo), Azúcar
13	8 cereales con miel	8	80,7	1,3	Harina de cereales dextrinados 70% (trigo, arroz, cebada, centeno, maíz, mijo, sorgo y avena), Azúcar

**Tabla 3 (continuación).** Ingredientes e información nutricional (por 100 g de producto) de las muestras de cereales infantiles analizadas.

Muestra	Características	Información nutricional 100g (g)			Ingredientes principales
		proteínas	hidratos	lípidos	
14	8 cereales con miel y fibra	8	77	1	Harinas de cereales dextrinados 72% (trigo integral, arroz integral, cebada, centeno, maíz, mijo, sorgo, avena)
15	8 cereales con miel	12,4	77,1	1,5	Harinas de cereales dextrinados 56% (trigo, arroz, avena, cebada, centeno, maíz, mijo y sorgo), Azúcar, Leche desnatada 14%
16	Multicereales con frutos secos, miel y frutas	8	80,5	2	Harinas de cereales dextrinados 64% (Trigo, Trigo integral, Arroz, Cebada, Centeno, Maíz, Avena), Azúcar, Frutas 8%
17	Cola-caó	8,2	80,5	2	Harinas de cereales dextrinados 67% ( Trigo, Arroz, Avena, Cebada, Centeno). Cola Cao 19%
18	Arroz	8,2	80,4	1,4	Harina de cereal dextrinado 86% (arroz), Azúcar, Fructooligosacáridos 3%
19	Avena	8	80,5	1,3	Harinas de cereales dextrinados (Avena 56%, Trigo), Azúcar







